Thèse présentée pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université Louis Pasteur - Strasbourg I

Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

par

Clélia Orange

« Un fluorophore photoactivable pour des études spatio-temporelles de la dynamique du cytosquelette d'actine ; les interactions des protéines à domaine SH3, le cas de Bzz1p. »

Soutenue publiquement le vendredi 6 juillet 2007

Devant les membres du jury :

Directrice de Thèse : Mme Barbara Winsor, Directeur de Recherche, Strasbourg

Directeur de Thèse : M. Maurice Goeldner, Professeur, Strasbourg

Rapporteur Interne : M. Serge Potier, Professeur, Strasbourg

Rapporteur Externe : M. Peter Philippsen, Professeur, Bâle, Suisse

Rapporteur Externe : M. Carsten Schultz, Directeur de Recherche, Heidelberg, Allemagne

Remerciements

Le travail présenté dans cette thèse a été réalisé au laboratoire de Chimie Bioorganique dirigé par le Professeur Maurice Goeldner et au laboratoire de Cytosquelette d'Actine et Trafic Intracellulaire dirigé par le Docteur Barbara Winsor. Je tiens à les remercier pour m'avoir accueilli dans leurs groupes et confié ce projet de thèse innovant à l'interface de la chimie et de la biologie, de m'avoir soutenu tout au long de ce travail passionnant mais empli d'embûches.

Je tiens à remercier Messieurs Peter Philippsen, Serge Potier et Carsten Schultz pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger ce travail de thèse.

Je désire également remercier les différentes personnes qui ont participé à ce travail :

Alexandre et Chantal qui m'ont fait découvrir l'univers des levures et du cytosquelette d'actine au tout début de ma thèse.

Karine qui m'a initié aux joies de la synthèse organique.

Alex qui grâce à ses judicieux conseils m'a permis d'obtenir ma molécule tant désirée et aussi un grand merci pour les corrections de ce manuscrit.

Jean-Luc Vonesch, Didier Hentsch et en particulier Pascal pour l'initiation au monde de la microscopie confocale.

Pascale pour la spectrométrie de masse des molécules chimiques et pour son aide pour la purification et aussi pour les moments de détente, les grandes discussions et la piscine.

Christelle pour les analyses de spectrométrie de masse des protéines.

Je remercie et je souhaite aussi bon courage à David et à Adeline qui m'ont aidé pour les expériences au cours de ma thèse et continuent mon projet.

Je n'oublie pas non plus les stagiaires que j'ai encadrés et qui m'ont permis d'avancer plus sereinement dans ce projet : Catherine, Cédric et Laurence.

Je voudrais bien sur remercier tous les nombreux membres de la Faculté de Pharmacie et de l'UMR7156 avec lesquels j'ai eu des relations et des échanges très enrichissants.

Je garderai toujours un excellent souvenir de ces moments passés, en particulier les discussions quotidiennes autour d'une tasse de thé, avec les personnes du laboratoire de Chimie Bioorganique : Bernard, Flo, Elias, Jean-Seb, Tic, Portia, Alexandre et Anne. Merci à Elias pour ces merveilleux repas libanais.

Je tiens aussi à remercier les membres du 4ème étage de l'IPCB, en particulier : Gladys et Johan pour leurs conseils et pour les corrections du manuscrit, Sylvie pour son enthousiasme et Vincent, Albert, Lydia pour les discussions scientifiques ou non autour de la table du midi.

Un grand merci à Cathy pour son aide dans tous les petits tracas de la vie administrative et l'organisation des pots. Toutes les sorties culturelles, les randonnées dans les Vosges et les piques-niques gargantuesques m'ont permis de souffler et me laissent des soucvenirs impérissables.

Sans ma famille et mes amis, ce travail n'aurait pas pu aboutir. Merci à mes parents et mes deux sœurs Elodie et Marjorie d'avoir été là et de m'avoir soutenu dans les moments de doute et qui m'ont permis de revoir régulièrement « mes » montagnes. Merci aussi à mes amis du Magistère : Christelle, Jérémy, Christophe et Julien et tous les amis de Strasbourg pour avoir été à mes côtés et avoir partagé ses années de thèse. Et bien sur, je n'oublie pas non plus mes amis de Grenoble et d'ailleurs : Samantha, tu m'as fait rêver avec tes photos de plongée, Nadège, Olivier.

Guillaume, ton soutien et ta patience tout au long de cette thèse qui fut un moment difficile de ma vie m'ont permis de rester optimiste. Merci pour tout.

Je remercie finalement le programme ACI – Dynamique et Réactivité des assemblages biologiques du Ministère de la Recherche, la Ligue contre le Cancer, l'Université Louis Pasteur et le CNRS qui ont financé ces travaux.

Table des matières

Liste des illustrations

Abréviations

δ	Déplacement chimique
ε	Coefficient d'extinction molaire
λ	Longueur d'onde
ϕ	Rendement quantique
ρ	Rendement de la réaction chimique
aa	acide aminé
ADF	Actin depolymerising factor
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine 5'-diphosphate
Alloc	Alloxycarbonyl
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine 5'-triphosphate
BAR	Bin/Amphiphysin/Rvs
BSA	Bovine serum albumine
BR	Basic region
Cbz	Carboxybenzyle (Z)
CC	Coiled coil
CDMNB	α-Carboxy-4,5-diméthoxy-2-nitrobenzyle
CMNB	5-Carboxyméthoxy-2-nitrobenzyle
CNB	α-Carboxy-2-nitrobenzyle
CoA	Coenzyme A
d	doublet
DCC	Dicyclohexylcarboxydiimide
DHFR	dihydrofolate réductase
DIAD	Diisopropylazodicarboxylate
DIC	Differential interference contrast
DIEA	Diisopropyléthylamine
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMF	Diméthylformamide
DMNB	4,5-Diméthoxy-2-nitrobenzyle
DMNPT	1-(4,5-Diméthoxy-2-nitrophényl)-2,2,2-trifluoroéthyle
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DTT	Dithiotréitol
EDT	Ethanedithiol
EDTA	Acide éthylène diamine tétracétique
EFC	Extended FER-CIP4
équ.	Équivalent
F-BAR	FCH-BAR
FCH	Fes/Cip4 homology
FH1/2	Formin homology domain 1/2
FlAsH	Fluorescein Arsenical Helix binder
FLIP	Fluorescence Loss In Photobleaching
FP	Fluorescent Protein
FRAP	Fluorescence Recovery After Photobleaching
GAP	GTPase Activating Protein
GBD	GTPases Binding Domain
GEF	Guanosine Exchange Factor
GFP	Green Fluorescent Protein
GM	Goeppert-Mayer
GP	groupe protecteur

GST	Glutathione S-Transférase
GTP	Guanosine 5'-triphosphate
hAGT	Human O^6-alkylguanine transferase
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid)
$h\nu$	Lumière
HPLC	High Perfomance Liquid Chromatography
IPTG	Isopropyl β-D-thiogalactopyranoside
J	Constante de couplage
Kd	constante de dissociation
KFP1	Kindling fluorescent protein-1
LY	Lucifer yellow carbohydrazide
m	multiplet
NA	Numeric aperture (ouverture numérique)
NB	*o*-Nitrobenzyle
NDA	Acide nitrilodiacétique
NHS	N-Hydrosuccinimide
NPF	Nucleation Promoting Factor
NTA	Acide nitrilotriacétique
ORF	Open Reading Frame
PAFP	Photoactivable fluorescent protein
PA-GFP	Photoactivatable - Green fluorescent protein
pb	paire de bases
PBS	Phosphate buffer saline
PCH	Pombe Cdc15 homology
PCP	peptide carrier protein
PCR	Polymerase chain reaction
PDB	Protein Databank
PMB	*para*-méthoxybenzyle
PMSF	Polyméthyl-sulfonyl-fluorure
ppm	partie par million
PPtase	phosphopantéthéine transférase
PS-CFP	Photoswitchable - Cyan fluorescent protein
ReAsH	Resorufin Arsenical Helix binder
RMN	Résonance magnétique nucléaire
s	singulet
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulphate-poly-acrylamide gel electrophoresis
SEM	[2-(triméthylsilyl)éthoxy]méthyl
SH	Scar Homology
SH3	Src homology 3
TA	Température ambiante
tBu	*tert*-Butyle
TEA	Triéthylamine
TEMED	N,N,N',N'-tétraméthyléthylènediamine
TFA	Acide trifluoroacétique
TH1/2	Tail homology 1/2
THF	Tétrahydrofuranne
Tris	tris-hydroxyméthylaminométhane
UV	Ultra-violet
VCA	WH2 - Cofiline homology – Acid
WASP	Wiskott-Aldrich syndrome protein
WAVE	WASP Verprolin homologous protein
WH1/2	WASP Homology 1/2
WIP	Wiskott-Aldrich Interacting Protein

Liste des protéines de levure et de leurs fonctions mentionnées au cours de ce travail

Act1p	Actine

Complexe Arp2/3 = centre de nucléation de l'actine

Arp2p	Actin-related-protein
Arp3p	Actin-related-protein
Arc40p/ARPC1	Arp2/3 Complex subunit
Arc35p/ARPC2	Arp2/3 Complex subunit
Arc18p/ARPC3	Arp2/3 Complex subunit
Arc19p/ARPC4	Arp2/3 Complex subunit
Arc15p/ARPC5	Arp2/3 Complex subunit

Assemblage des taches corticales d'actine

Las17/Bee1p	Homologue de WASP
Abp1p	Actin-binding protein
Pan1p	Homologue de Eps15
Myo3p	Myosine de type I
Myo5p	Myosine de type I
Ark1p	Actin-regulating kinase – kinase de Pan1p
Prk1p	Kinase de Pan1p
Bbc1p	Inhibe Las17p
Sla1p	Inhibe Las17p
Lsb1p	Las-seventeen-binding protein
Lsb3p	Las-seventeen-binding protein
Lsb4p/Ysc84p	Las-seventeen-binding protein
Bzz1p	Active Las17p
App1p	Actin-patch protein
Rvs167p	Reduced Viability on Starvation – Homologue amphiphysine
Rvs161p	Reduced Viability on Starvation – Homologue amphiphysine
Lsp1p	Composant de l'eisosome
Pil1p	Composant de l'eisosome
Sur7p	Protéine membranaire

Assemblage des câbles d'actine

Bni1p	Formine
Bnr1p	Formine
Bud6p	Activation Bni1p
Cyk2p/Hof1p	Altération fonction des formines
Vrp1p	Verproline – Homologue de WIP
Bim1p	Protéine de liaison aux microtubules
Kar9p	Protéine de liaison aux microtubules
Myo2p	Myosine de type V – transport des cargos
Myo1p	chaine lourde de la myosine de type II

Sélection du site de bourgeonnement et polarité

Bud1p	GTPase de type Ras
Bud2p	GAP de Bud1p
Bud5p	GEF de Bud1p
Cdc24p	GEF de Cdc42p
Cdc42p	GTPase de type Rho
Rga1p	GAP de Cdc42p

Bem1p	Protéine adaptatrice
Bem2p	GAP de Cdc42p
Bem3p	GAP de Cdc42p

Protéine de coiffe de l'actine

Sac6p	Fimbrine
Tpm1/Tpm2p	Tropomyosine
Cap1/Cap2p	protéine de coiffe
Crn1p	Coronine
Iqg1p/Cyk1p	Homologue IQGAP
Aip1p	Dépolymérisation de l'actine

Protéines d'échafaudage et adaptatrices de la clathrine

Clc1p	Clathrine
Ede1p	Homologue de Eps15R
Ent1p	Homologue des epsines
Ent2p	Homologue des epsines
Sla2p	Homologue HIP1R
Scd5p	
Yap1801p	Homologue AP180
Yap1802p	Homologue AP180

Kinases intervenant dans le métabolisme des phosphoinositides

ab1p	1-phosphatidylinositol-3-phosphate 5-kinase
Mss4p	Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase
Vps34p	Phosphatidylinositol 3-kinase

Avant-propos

Avant Propos

L'actine est une protéine essentielle et représente, avec les protéines qui s'y associent, 25 % des protéines totales d'une cellule. Les microfilaments d'actine sont des polymères formant un cytosquelette, une architecture interne à la cellule. Celui-ci est hautement organisé et assure à la cellule sa forme et ses propriétés mécaniques et dynamiques. Sa désorganisation, observée dans de multiples cancers, est importante dans la transformation d'une cellule cancéreuse, sa motilité et sa capacité d'invasion. Des travaux au laboratoire ont permis d'isoler des protéines importantes pour la formation des filaments d'actine. Ces résultats montrent que certains modules protéiques, appelés domaines SH3 (Src Homology 3), interagissent directement avec ces effecteurs de la polymérisation et participent au remodelage de l'actine. Nous souhaitons étudier la dynamique de ces protéines au sein de la cellule afin de mieux appréhender leurs rôles. Bzz1p est une des ces protéines chez la levure et son homologue humain serait un lien entre la membrane cellulaire et le cytosquelette d'actine. Lors de ma thèse, je souhaitais déterminer si Bzz1p interagit directement sur la polymérisation et/ou sert de protéine adaptatrice entre la machinerie de polymérisation et la membrane cellulaire.

Une meilleure compréhension des fonctions et interactions d'une protéine dans son environnement naturel, c'est-à-dire dans la cellule, nécessite de connaître sa localisation et sa dynamique au sein de cette cellule. Pour cela, on utilise le plus souvent des techniques de microscopie à fluorescence. A ce jour de nombreuses méthodes, biologiques ou chimiques, ont été développées. Chacune présente des avantages et des inconvénients mais pour le moment aucune n'est idéale. Au cours de mes années de thèse, j'ai cherché à développer une solution nouvelle à cette problématique. Ainsi, mon but a été de développer et synthétiser un nouveau fluorophore photoactivable, dont la fluorescence est masquée, capable de se lier à une protéine d'intérêt, par exemple Bzz1p ou une autre protéine du cytosquelette d'actine, par un motif de reconnaissance spécifique. Une fois ce fluorophore irradié dans une zone choisie de la cellule, les quelques protéines devenues fluorescentes pourraient alors être suivies par microscopie.

La synthèse de la sonde photoactivable s'est révélée plus difficile et plus longue que prévue. En parallèle au développement de la sonde photoactivable qui s'est effectué dans le laboratoire de Chimie Bioorganique dirigé par le Pr. Maurice Goeldner, j'ai commencé un travail de recherche sur la protéine Bzz1p impliquée dans la régulation du cytosquelette d'actine dans la levure. Ce travail s'est effectué au laboratoire

Cytosquelette d'Actine et Trafic Intracellulaire dirigé par le Dr. Barbara Winsor. Dans un souci de clarté j'ai séparé les deux aspects différents de ce travail de thèse en deux parties distinctes de ce manuscrit.

Ainsi dans un premier temps, j'aborde des notions générales de fluorescence et de lumière mono ou bi-photon, qui sont suivies par un bref exposé sur les fluorophores photoactivables et les groupements photolabiles déjà décrits dans la littérature. Ensuite, je présente un état des lieux sur les méthodes déjà disponibles pour marquer une protéine au sein d'une cellule. Enfin je décris les différentes stratégies de synthèse d'un fluorophore photoactivable, capable de se lier à une protéine, développées au cours de cette thèse et les résultats obtenus au niveau chimique, photochimique et cellulaire.

Dans un deuxième temps, je présente mon travail sur la protéine, Bzz1p, dont j'ai voulu préciser les interactions avec différents partenaires cellulaires. Dans une première partie je décris l'organisation générale du cytosquelette d'actine ainsi que ses mécanismes de régulation au sein de la levure *Saccharomyces cerevisiae*, le modèle d'étude au laboratoire. J'aborde ensuite les relations entre le cytosquelette d'actine et les mécanismes d'endocytose, suivi par un état des lieux sur le rôle des protéines de la famille PCH dont Bzz1p est membre. Dans les parties suivantes, je présente et discute les résultats obtenus sur les partenaires de Bzz1p identifiés au cours de cette thèse.

Partie 1.

Développement d’un fluorophore photoactivable

Chapitre 1.

Fluorophores photoactivables et étiquettes chimiques de protéines

Chapitre 1. Fluorophores photoactivables et étiquettes chimiques de protéines

Avant de présenter les stratégies de synthèse utilisées pour développer un fluorophore photoactivable capable de se lier à une protéine d'intérêt, je précise les concepts importants. Dans cette partie, j'aborde les notions de fluorescence puis de l'excitation multi-photonique qui permettent de visualiser des fluorophores. Ensuite je définis le concept de fluorophore photoactivable ainsi que les groupements photolabiles utilisés jusqu'à présent. Enfin, je présente les différentes façons d'étiqueter une protéine afin de pouvoir la visualiser par microscopie à fluorescence. En effet, il est possible d'utiliser des protéines fluorescentes ou des marqueurs chimiques.

I. Principe de la fluorescence

Une molécule fluorescente (fluorophore) possède la propriété d'absorber de l'énergie lumineuse (lumière d'excitation) et de la restituer rapidement sous forme de lumière fluorescente (lumière d'émission). Une fois l'énergie du photon absorbée, la molécule se trouve alors dans un état électroniquement excité, généralement un état singulet, que l'on note S1* (Figure 1). Le retour à l'état fondamental peut alors se faire de différentes manières. L'une d'elles est l'émission d'un photon, c'est le phénomène de fluorescence. La longueur d'onde ré-émise par la molécule excitée peut être de même longueur d'onde (fluorescence de résonance) ou de longueur d'onde plus grande. Le fait que la longueur d'onde d'émission soit plus grande provient du fait que, dans les milieux liquides en particulier, la molécule retourne à l'état fondamental à partir du niveau de vibration le plus bas de l'état excité (règle de Kasha's). Cette différence est appelée déplacement de Stokes.

Ce déplacement du spectre d'émission vers des longueurs d'onde plus élevées donc de moindre énergie, décrit par la loi de Stokes, est essentiel pour la séparation et la détection de la lumière de fluorescence, signal spécifique délivré par le fluorophore.

Il existe un grand choix de fluorochromes, chacun pouvant être caractérisé par ses spectres d'excitation et d'émission. Les différentes caractéristiques des fluorophores sont :

- Longueurs d'onde : celles qui correspondent aux pics des spectres d'excitation et d'émission

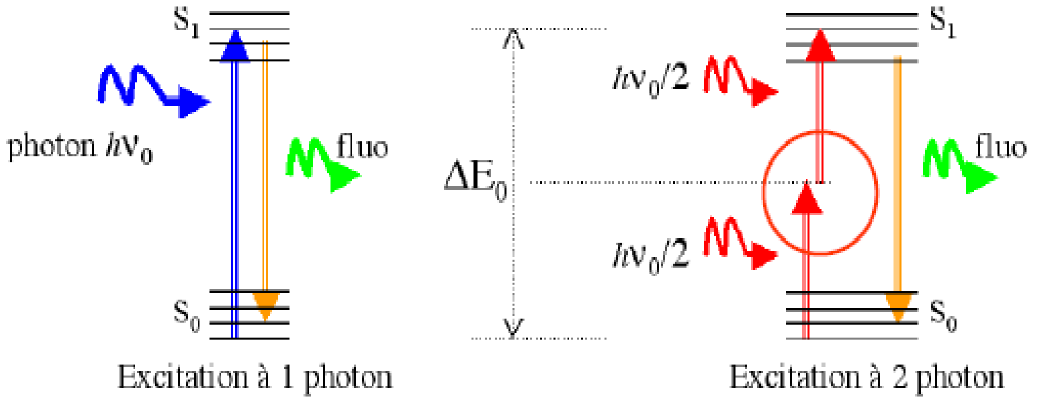


Figure 1. Excitation mono- et bi-photonique. Les photons doivent arriver dans une fenêtre de l'ordre de 10-18 secondes (une attoseconde). Cette échelle de temps est compatible avec la durée de vie de cet état virtuel (10^{-17} secondes soit 0,01 femtoseconde).
Source : http://confocal.medecine.uhp-nancy.fr/JST/Amplitude.pdf

- Coefficient d'extinction (ou absorption molaire) : il relie la quantité de lumière absorbée, à une longueur d'onde donnée, à la concentration du fluorophore en solution ($M^{-1}.cm^{-1}$)
- Rendement quantique : efficacité relative de la fluorescence comparée aux autres voies de désexcitation (= nombre de photons émis / nombre de photons absorbés)
- Durée de vie à l'état excité : c'est la durée caractéristique pendant laquelle la molécule reste à l'état excité avant de retourner à son état basal (ordre de la picoseconde). Cette durée est assimilable à la demi-vie de l'état excité.
- Photoblanchiment (photobleaching) : lorsque la molécule est à l'état excité, il existe une certaine probabilité pour qu'elle participe à des réactions chimiques (on parle alors de réactions photochimiques), en particulier avec l'oxygène sous forme de radicaux libres. Le fluorochrome perd alors ses propriétés de fluorescence. Autrement dit, quand on excite une solution de molécules fluorescentes, une certaine proportion d'entre elles est détruite à chaque instant et par conséquent l'intensité de fluorescence décroît au cours du temps. Ce phénomène peut être gênant, notamment en microscopie de fluorescence, mais il peut également être mis à profit pour mesurer la mobilité moléculaire par la méthode de redistribution de fluorescence après photoblanchiment (FRAP) ou de FLIP (Perte de fluorescence au cours d'un photoblanchiment local).

II. Excitation à deux photons

Les sondes fluorescentes peuvent être excitées par une source de lumière monophotonique ainsi que par une source multiphotonique. En effet, le développement récent de l'utilisation d'un procédé optique non-linéaire, appelé excitation multiphotonique permet de concentrer le flux de photons incident temporellement et spatialement, par exemple dans un volume aussi petit que des structures intracellulaires ou qu'une seule synapse d'un neurone. En 1931, Maria Göppert-Mayer a prédit qu'un atome peut être excité après l'absorption simultanée de deux quanta de lumière, dont la somme des fréquences est égale à la fréquence requise pour l'excitation de l'atome (Göppert-Mayer, 1931; Göppert, 1929). L'invention du laser a permis à Kaiser et Garrett de démontrer que l'excitation en bi-photon induit la fluorescence de $CaF_2:Eu^{3+}$ en 1961 (Kaiser et Garrett, 1961). Denk a démontré le relargage d'un effecteur biologique par excitation bi-photonique dans des cellules en culture en utilisant une version cagée d'un neurotransmetteur (Denk *et al.*, 1990). D'excellentes revues ont été publiées sur l'utilisation de l'excitation multiphoton en microscopie biologique (Denk *et al.*, 1995; Denk

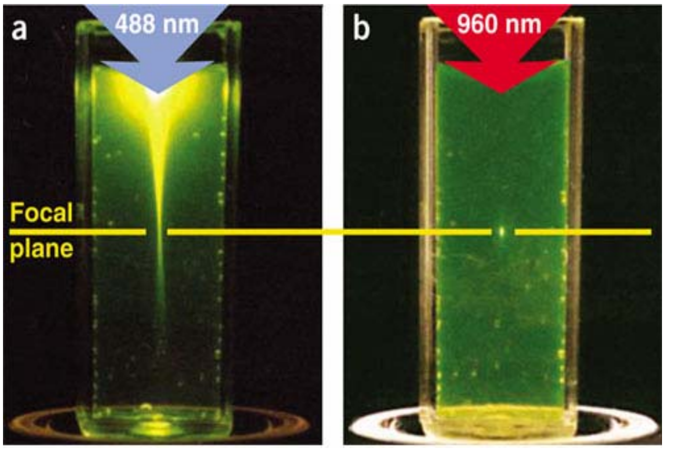


Figure 2. Localisation de l'excitation par excitation mono- et bi-photonique.
(a) Excitation mono-photonique d'une solution de fluorescéine excitée par une lumière focalisée (0,16 NA) de 488 nm. (b) Excitation bi-photonique en utilisant une lumière focalisée (0,16 NA) et pulsée en femtosecondes de 960 nm.
Adaptée de Zipfel *et al*, 2003.

et Svoboda, 1997; Helmchen et Denk, 2005; Helmchen et Denk, 2002; Konig, 2000; Xu et Webb, 1996; Xu et Webb, 1997; Zipfel *et al.*, 2003).

Ainsi en théorie, en excitation à deux photons, un chromophore absorbe deux photons non-résonants de la même longueur d'onde simultanément (dans la femtoseconde) pour produire un état excité électroniquement, lequel peut subir des procédés photophysiques ou photochimiques, tel que la fluorescence, la phosphorescence ou une réaction chimique. Les deux photons exploitent l'état d'excitation virtuel, délivrant la même énergie qu'un seul photon d'une longueur d'onde deux fois plus faible (Figure 1). Dans une photolyse médiée par une excitation bi-photonique, telle que la libération d'une biomolécule à partir d'un précurseur photolabile après excitation, les étapes mécanistiques sont identiques à celles observées après une excitation mono-photonique conventionnelle. La probabilité d'absorption de deux photons simultanément dépend du carré de l'intensité de la lumière, c'est pour cette raison qu'il est nécessaire d'utiliser des lasers pulsés qui ont une forte intensité lumineuse. Le résultat est que l'excitation se produit seulement au point focal du faisceau lumineux, le volume focal pouvant être d'environ 1 μm^3.

Les principaux avantages de l'excitation à deux photons sont que la zone excitée est très petite (intrinsèquement confocale) (Figure 2) ; la fluorescence hors plan focal n'existe quasiment pas et elle permet une pénétration plus grande des tissus. Il y a aussi un photo-blanchiment général et photo-toxicité plus faible. Par contre au point focal le photo-blanchiment est plus rapide. Un important flux de photons est nécessaire d'où une balance délicate entre puissance et blanchiment.

La photoactivation des composés photoactivables se fait généralement sous l'action d'une lumière ultra-violette (UV), de haute énergie, qui peut causer des dommages sur les échantillons cellulaires et générer de l'autofluorescence. De plus, la lumière UV manque de sélectivité spatiale en trois dimensions lors de l'excitation, c'est pour ces raisons qu'il est important de développer des sondes photoactivables par une lumière multiphotonique.

Maintenant la notion de fluorophore photoactivable va être précisée et les exemples présents dans la littérature seront détaillés.

III. Fluorophores photoactivables

Le concept de précurseur photoactivable de biomolécules est apparu à la fin des années 70 (Engels et Schlaeger, 1977). Les précurseurs photoactivables de biomolécules sont appelés ligands « cagés » par les biologistes. Ils permettent de transformer un composé biologiquement inerte en composé actif de façon très rapide et efficace (de

quelques nanosecondes à quelques millisecondes) sous l'action de la lumière assurant un contrôle spatio-temporel de la libération de la biomolécule. Ainsi un groupement photolabile doit être lié judicieusement à la biomolécule afin de masquer la fonctionnalité de la biomolécule étudiée. Dans le cas d'un fluorophore photoactivable, c'est la fluorescence qui est masquée et qui est libérée sous l'action de la lumière. En outre, la cinétique de la réaction de photolyse doit être plus rapide que le phénomène biologique étudié. Elle peut être de l'ordre de la nanoseconde dans le cas de l'étude du repliement d'une protéine ; de la microseconde pour le relargage d'un neurotransmetteur ; de la milliseconde pour l'étude de réactions enzymatiques. La cinétique de photoactivation d'un fluorophore sera conditionnée par la nature du phénomène biologique étudié.

A. Critères d'un fluorophore photoactivable efficace

Les conditions nécessaires pour qu'une sonde fluorescente « cagée » soit efficace ont été décrites par Mitchison (1989, 1994).

Le composé « cagé » doit être soluble et stable (à l'abri de la lumière) en milieu aqueux tamponné au pH physiologique.

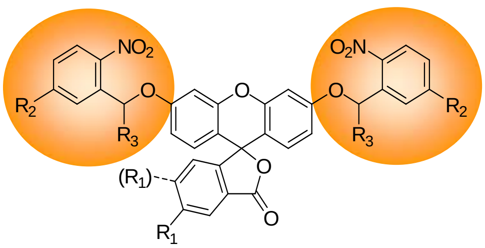
La fluorescence du fluorophore après photoactivation doit être régénérée avec une forte brillance de manière sélective, efficace et rapide. L'efficacité de la réaction de photo-fragmentation se traduit par le produit ε_λ x ϕ, où ε_λ est le coefficient d'extinction molaire à la longueur d'onde d'irradiation λ et ϕ le rendement quantique de la réaction (= nombre de photons qui conduisent à la fragmentation de la molécule / nombre de photons absorbés).

Le groupement photolabile doit absorber dans l'UV-visible, afin de limiter l'absorption (et les dégradations possibles) de la lumière par le système biologique étudié.

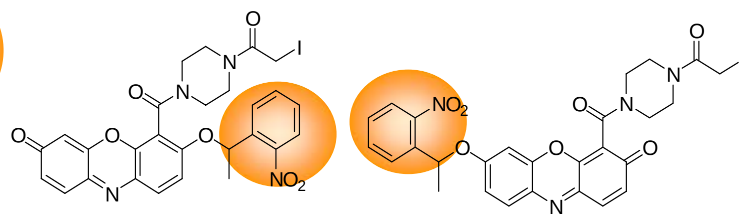
Les produits issus de la photolyse, c'est-à-dire le fluorophore et le groupement résiduel de la « cage », doivent être inertes photochimiquement. Cela signifie que ces molécules doivent avoir une absorption la plus faible possible à la longueur d'onde d'irradiation afin d'éviter d'entrer en compétition avec l'évolution de la photolyse (effet de filtre). De plus le groupement libéré doit être inerte biologiquement, il ne doit pas réagir ou interférer avec le système biologique étudié.

Si l'on veut étudier des protéines intracellulaires, il est nécessaire que le fluorophore photoactivable puisse traverser les membranes biologiques

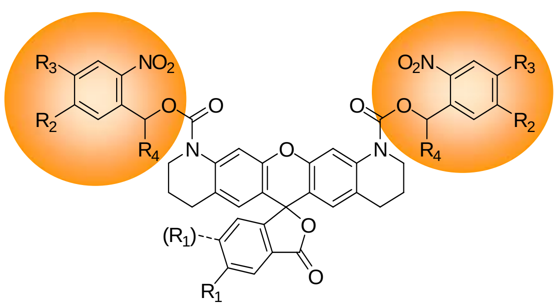
De plus, il faut aussi que la synthèse soit facilement réalisable et que le fluorophore photoactivable s'attache facilement et surtout spécifiquement à une protéine. Ce dernier critère est le plus difficile à prévoir à partir de la structure moléculaire. Empiriquement il



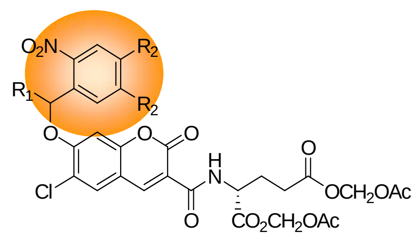
A. Fluorescéine “cagée”



B. Résorufines “cagées”



C. Rhodamine “cagée”



D. Coumarine “cagée”

Schéma 1. Structure de différents fluorophores photoactivables.

est nécessaire que les sondes ne soient ni trop hydrophobes ni trop fortement chargées et que la liaison avec une protéine soit forte voire covalente.

B. Stratégie générale

Pour « cager » des fluorophores, la structure électronique est perturbée par l'ajout d'un groupement photolabile qui rend alors la molécule non fluorescente ou faiblement fluorescente. La réaction de photolyse permet la libération du fluorophore et le retour à sa structure électronique initiale et donc il redevient fluorescent. La plupart des applications biologiques et chimiques ont été faites par le groupe de Mitchison. Par exemple, la fluorescéine « cagée » (Schéma 1A) pour l'étude de la tubuline (Mitchison, 1989; Sawin et Mitchison, 1991), la résorufine photoactivable (Schéma 1B) pour marquer le cytosquelette d'actine (Theriot et Mitchison, 1991) ou encore la rhodamine « cagée » (Schéma 1C). Pour la fluorescéine et les rhodamines photoactivables, deux groupements photolabiles sont ajoutés afin de bloquer le composé sous une forme lactone non fluorescente. Pour la résorufine « cagée », le fluorophore est sous une forme non ionisable, ayant pour résultat un décalage de l'absorption vers le bleu et une extinction de la fluorescence (Pour revue : Mitchison *et al.*, 1998). Récemment, une 7-hydroxycoumarine « cagée » (Schéma 1D) par un groupement 1-(2-nitro-phényl)éthyle a été décrite. Dans ce cas comme pour la résorufine photoactivable, le fluorophore est sous une forme non ionisable et le décalage d'absorption vers le bleu conduit à une extinction de la fluorescence. Ces coumarines « cagées » ont l'intérêt d'être photoactivable sous l'action d'une lumière mono ou bi-photonique avec un rendement quantique à deux-photon de 0,37 à 0,68 GM (1 GM = 10^{-50} cm^4-s/photons) à 740 nm, ce qui est relativement élevé (Zhao *et al.*, 2004). De plus la coumarine est peu sensible au photoblanchiment. Et elle agit comme une « antenne » pour la « photolyse assistée par le substrat » de la partie 2-nitrophényléthyle, c'est-à-dire que le rendement quantique de photolyse est augmenté en comparaison à un substrat classique (Zhao *et al.*, 2004).

De nombreuses revues sur les composés « cagés » et les groupements photolabiles ont été publiées : Adams et Tsien, 1993; Bochet, 2002; Corrie et Trentham, 1993; Dorman et Prestwich, 2000; Loudwig *et al.*, 2002; McCray et Trentham, 1989; Pelliccioli et Wirz, 2002; Willner *et al.*, 1996. Et un volume de « Methods in Enzymolgy » y est consacré (Marriott, 1998) ainsi qu'un livre publié par Wiley-VCH Eds (Goeldner et Givens, 2005).

Dans la section suivante, je décris les groupements *o*-nitrobenzyles, les seuls groupements utilisés pour la synthèse de fluorophores photoactivables, ainsi que leurs propriétés.

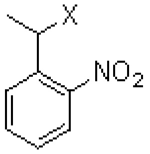
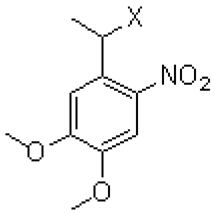
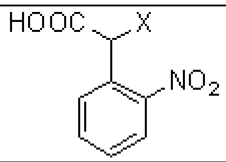
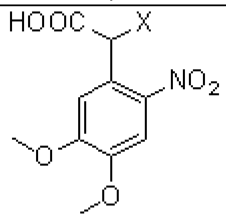
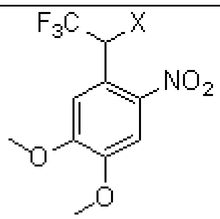
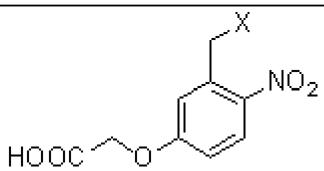
Structure	Nom (Acronyme)	Solubilité aqueuse	Efficacité (ε_{350nm} x ϕ)
	*o*-Nitrobenzyle (NB)	Faible	λ_{max} ≈ 260 nm ε_{350nm} faible $t_{1/2}$ ≈ ms
	4,5-Diméthoxy-2-nitrobenzyle (DMNB)	Faible	ϕ faible λ_{max} ≈ 340 nm
	α-Carboxy-2-nitrobenzyle (CNB)	Bonne	ϕ très élevé ε_{350nm} faible
	α-Carboxy-4,5-diméthoxy-2-nitrobenzyle (CDMNB)	Bonne	ϕ faible ε_{350nm} faible
	1-(4,5-diméthoxy-2-nitrophényl)-2,2,2-trifluoroéthyle (DMNPT)	Faible	λ_{max} ≈ 360 nm ϕ élevé
	5-Carboxyméthoxy-2-nitrobenzyle (CMNB)	Bonne	λ_{max} ≈ 260 nm ε_{350nm} faible $t_{1/2}$ ≈ ms

Tableau 1. Variations effectuées sur le groupement *o*-nitrobenzyle (ϕ = rendement quantique de la réaction de photolyse, $t_{1/2}$ = cinétique de la réaction).

IV. Groupements photolabiles

A. Groupements *o*-nitrobenzyles

Les groupements ortho-nitrobenzyles ont été introduits en 1970 par Patchornik et al. (1970) et sont les groupements photolabiles les plus couramment utilisés, ce sont les seuls à avoir été utilisés à ce jour pour masquer la fluorescence d'un fluorophore.

Historiquement, la première fonction chimique masquée par le groupement *o*-nitrobenzyle est la fonction acide phosphorique de l'ATP (Engels et Schlaeger, 1977). Ce groupement peut être greffé à une biomolécule sur diverses fonctions chimiques et permet de régénérer quantitativement ces fonctions après réaction photochimique. D'un point de vue synthétique, ce groupement a été greffé avec succès à diverses fonctions chimiques présentes sur la biomolécule à « cager ». Divers substituants ont été introduits en position benzylique et sur le noyau benzylique afin d'améliorer les propriétés photochimiques de ce groupement (rendement quantique, cinétique et/ou coefficient d'extinction molaire à la longueur d'onde d'irradiation). Le Tableau 1 résume ces modifications (pour revue : Goeldner, 2005). L'introduction d'un groupement méthyle en position benzylique a permis d'améliorer les cinétiques de 3 ordres de grandeur : des millisecondes aux microsecondes. De plus, l'introduction d'un groupement carboxylate en position benzylique a permis d'augmenter le rendement quantique de la réaction de photofragmentation (Milburn *et al.*, 1989). L'ajout d'un groupement carboxylate, en position benzylique ou sur le cycle aromatique, a aussi l'avantage d'augmenter la solubilité des composés dans des milieux tamponnée au pH physiologique. Enfin des groupements méthoxy ont également été introduits sur le noyau aromatique de l'*o*-nitrobenzyle afin de déplacer la longueur d'onde d'absorption de ces dérivés de 260 nm vers 340 nm ce qui permet de moins dégrader les systèmes biologiques lors de la photolyse. Mais dans ce cas, les modifications peuvent entraîner une diminution des rendements quantiques et / ou des cinétiques suivant la nature de la fonction qui a été masquée. L'introduction en position benzylique d'un groupement trifluorométhyle permet d'augmenter le rendement quantique de la réaction de photofragmentation (Specht et Goeldner, 2004).

B. Groupements o-nitrophénéthyles

Un nouveau groupement dérivant du groupement o-nitrobenzyle a été utilisé pour « cager » la fonction phosphate des nucléotides, il s'agit du groupement o-nitrophénéthyle (Schéma 2) (Walbert et al., 2001).

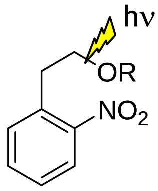


Schéma 2. Groupement o-nitrophénéthyle.

Au laboratoire, un dérivé de type o-nitrophénéthyle, le 3-(4,5-diméthoxy-2-nitrophényl)-2-butyle (DMNPB) (Schéma 3) a été utilisé pour « cager » le glutamate (Specht et al., 2006). Sa longueur d'onde d'excitation est proche de 360 nm, la cinétique de la réaction de photofragmentation est de l'ordre de la milliseconde et le rendement quantique de la réaction de photolyse est élevé (ϕ = 0,3). De plus, la qualité de la réaction de photolyse est bonne car 96 % de glutamate est libéré.

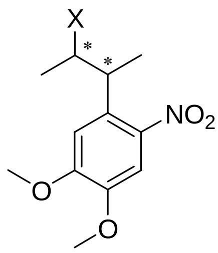
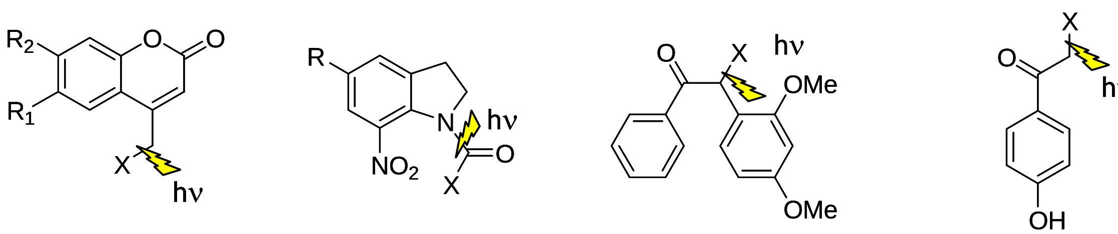


Schéma 3. Le 3-(4,5-diméthoxy-2-nitrophényl)-2-butyle (DMNPB).

D'autres groupements photolabiles (Schéma 4) tels que les dérivés de benzoïne, de 1-acyl-7-nitroindolines, de p-hydroxyphénacyle et de coumarine sont utilisés pour « cager » diverses fonctions chimiques.



Type coumarine Type 7-nitroindoline Type benzoïne Type *p*-hydroxyphénacyle

Schéma 4. Autres groupements photolabiles utilisés.

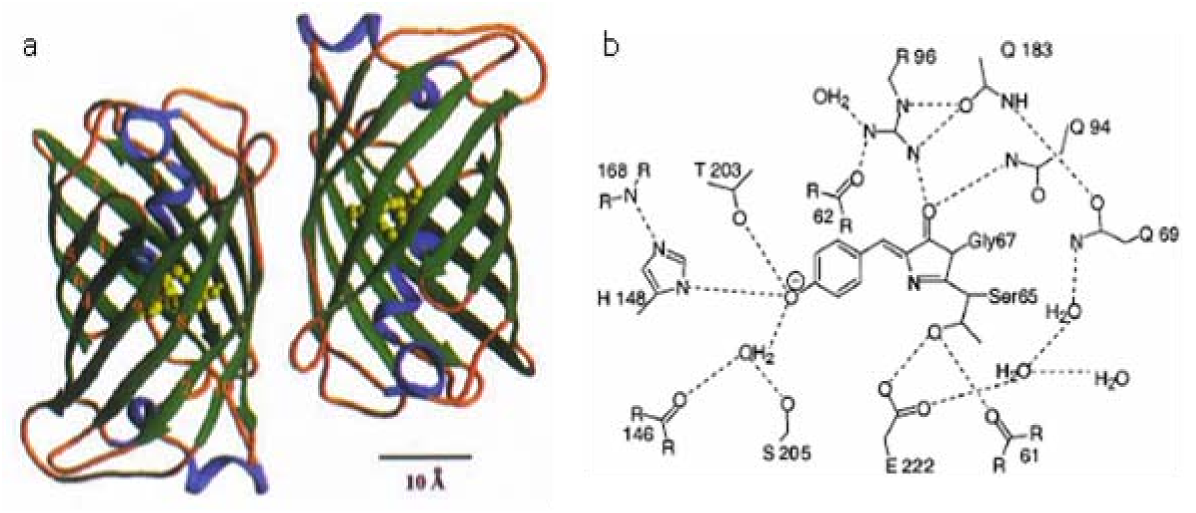


Figure 3. Structure de la GFP.
a) Forme générale de la GFP et son association en dimère. Onze feuillets b forment le tonneau au centre duquel se trouve le fluorophore (code pdb 1GFL).
Adaptée de Yang *et al*, 1996.
b) Diagramme schématique de l'interaction entre le chromophore et ses environs dans le mutant S65T. Les liaisons hydrogènes possibles sont montrées en tiret.
Adapté de Ormo *et al*, 1996.

Company	Fluorescent proteins available				
	Blue, Cyan	Green	Yellow	Red	Photoactivatable
Amaxa (www.amaxa.com)		pmaxFP-Green[a]	pmaxFP-Yellow[a]	pmaxFP-Red[a]	
BD Biosciences Clontech (www.clontech.com)	AmCyan1	AcGFP1 ZsGreen1	ZsYellow1	DsRed2 DsRed-Express DsRed-Monomer Timer AsRed2 HcRed1	
Evrogen (www.evrogen.com)	PS-CFP2	TurboGFP	phiYFP	JRed	KFP-Red PS-CFP2
Invitrogen (www.invitrogen.com)	BFP CFP	EmGFP	YFP		
Lux Biotechnology (www.luxbiotech.com)		RmGFP PtGFP RrGFP			
MBL International (www.mblintl.com)	Midoriishi-Cyan	Azami Green		Kusabira-Orange	Dronpa Green Kaede KikGR
NanoLight Technology (www.nanolight.com)		RmGFP PtGFP RrGFP			
Promega (www.promega.com)		Monster Green			
Stratagene (www.stratagene.com)		hrGFP			

[a]pmaxFP-Green, pmaxFP-Yellow, and pmaxFP-Red are other names of TurboGFP, phiYFP, and JRed proteins, respectively.

Tableau 2. Grande variété spectrale des protéines fluorescentes disponibles commercialement.
Adapté de Chudakov *et al*, 2005.

Les propriétés et caractéristiques de ces différents groupements sont intéressantes et ils peuvent être de très bonnes alternatives au groupement *o*-nitrobenzyle. Cependant comme ils n'ont pas encore été utilisés pour masquer des fluorophores, ils ne sont pas abordés dans cette thèse.

V. Marquage spécifique de protéines

Pour visualiser une protéine et suivre sa dynamique à l'aide d'un microscope à fluorescence, il est nécessaire que cette protéine soit étiquetée à l'aide d'un fluorophore. Le fluorophore peut-être d'origine biologique comme les protéines fluorescentes fusionnée à la protéine d'intérêt ou il peut être d'origine chimique. Dans ce cas là, le fluorophore est alors capable de reconnaître puis de se lier à une protéine d'intérêt par une interaction entre le motif de reconnaissance de la sonde chimique et une étiquette protéique ou peptidique.

A. Marqueurs protéiques

1) Protéines fluorescentes

En imagerie cellulaire, la découverte (Shimomura *et al.*, 1962), le clonage (Prasher *et al.*, 1992) et l'expression hétérologue de la « green fluorescent protein » ou GFP issue de la méduse *Aequorea victoria* a été une révolution dans le domaine de l'imagerie cellulaire (pour revue : Tsien, 1998; Zimmer, 2002). L'expression de la GFP seule ou en fusion avec d'autres protéines mène à sa fluorescence dans le visible sans nécessiter de cofacteurs autre que le dioxygène. En effet, le chromophore, un *p*-hydroxybenzylidèneimidazolinone (Cody *et al.*, 1993; Prasher *et al.*, 1992), est généré par une cyclisation et une oxydation spontanées de trois acides aminés adjacents (Ser-Tyr-Gly) enfermés au cœur d'un tonneau β(Figure 3). La GFP est un membre de la grande famille des protéines homologues fluorescentes (FPs) (Chudakov *et al.*, 2005; Matz *et al.*, 2006; Verkhusha et Lukyanov, 2004) provenant pour la plupart de cœlentérés marins, avec différentes couleurs provenant de variations dans la structure et l'environnement du chromophore (Shaner *et al.*, 2005). Plusieurs laboratoires ont, par mutagénèse, encore augmenté la diversité spectrale des FPs, amélioré leur brillance et l'efficacité de repliement (Pedelacq *et al.*, 2006) et diminué leur oligomérisation (pour revue : Shaner *et al.*, 2005).

De nombreuses protéines fluorescentes sont maintenant commercialisées, comme on peut le voir dans le Tableau 2.

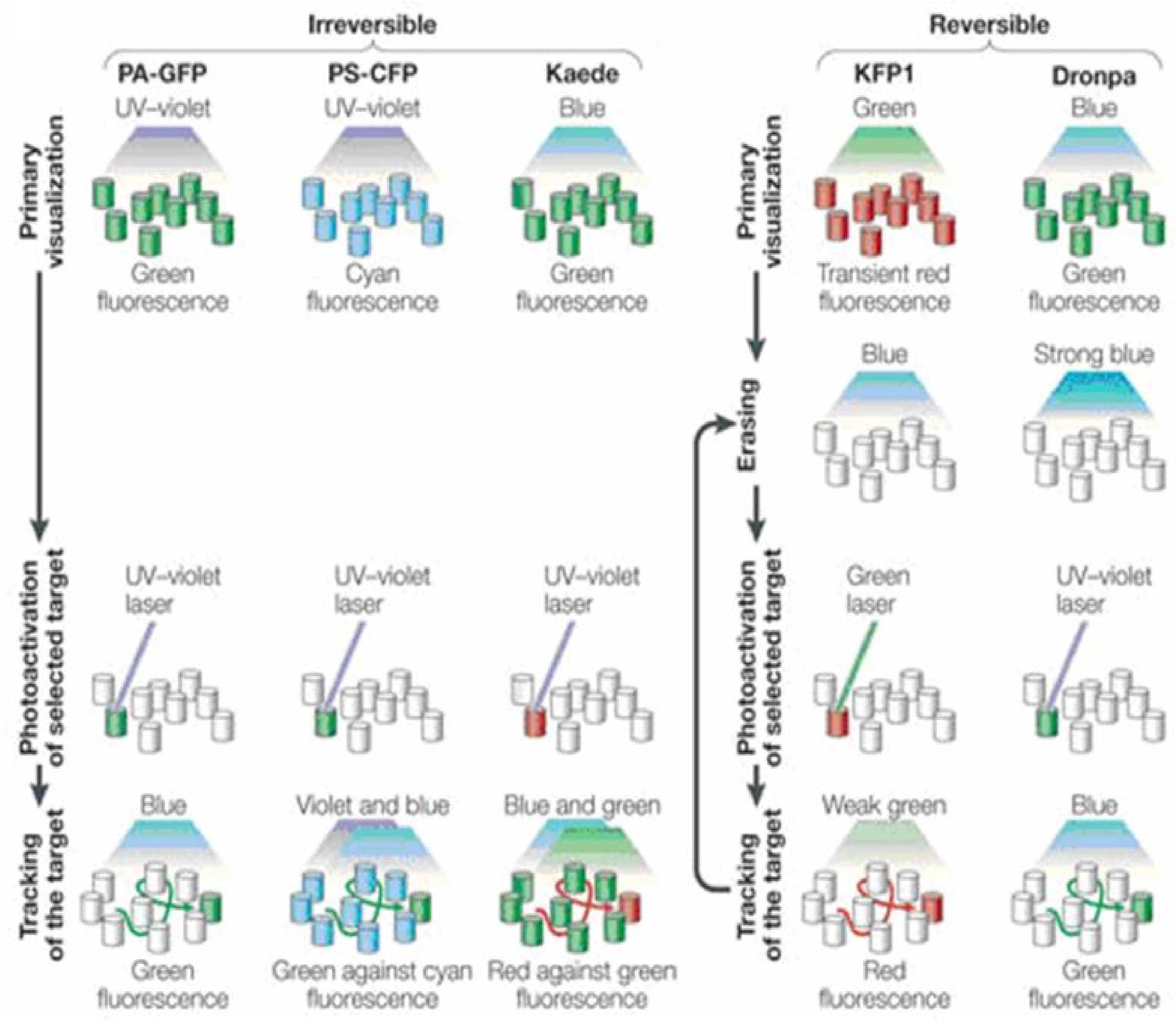


Figure 4. Propriétés chimiques et spectrales de PAFPs. Procédures pour le marquage sélectif en utilisant des PAFPs irréversible et réversible. Les cylindres représentent un objet étiqueté avec une PAFP, et les cylindres sont colorés selon les couleurs d'émission avant et après photoactivation. La lumière d'excitation ou d'activation est montrée au dessus des cylindres comme des trapèzes colorés ou des lignes, respectivement. Seule l'activation réversible est montrée pour KFP1 par simplicité (KFP1 est capable d'une photoactivation réversible et irréversible dépendante de l'intensité et de la durée de la lumière d'activation. KFP1, kindling fluorescent protein-1; PA-GFP, photoactivatable green fluorescent protein; PS-CFP, photoswitchable cyan fluorescent protein.
Adaptée de Lukyanov *et al*, 2005.

Certaines mutations peuvent créer des photosensibilisateurs tels que le KillerRed (λ_{max} ≈ 585 nm) développé par mutagénèse d'une chromoprotéine d'hydrozoaire, anm2CP (Bulina *et al.*, 2006). Dans la technique CALI (Chromophore-assisted laser inactivation), un fluorophore est irradié et produit des espèces oxygénées réactives qui peuvent inactiver une protéine proche du fluorophore. Pour une application biologique de ce principe, le fluorophore doit être conjugué à une entité biologique proche de la protéine cible de la photoinactivation.

Enfin, d'autres mutations ont conduit au développement de protéines fluorescentes photoactivables, elles sont décrites dans le paragraphe suivant.

2) Protéines fluorescentes photoactivables

Récemment, de nouvelles possibilités d'imagerie cellulaire sont arrivées avec le développement de protéines fluorescentes photoactivables ou PAFPs. Ces protéines fluorescentes sont capables de changements prononcés dans leurs propriétés spectrales en réponse à une irradiation lumineuse à une longueur d'onde et à une intensité spécifiques. Certaines protéines passent d'un état peu ou pas fluorescent à un état très fluorescent, c'est une photoactivation ; alors que d'autres protéines changent de couleur de fluorescence, c'est une photoconversion (pour revue : Chapman *et al.*, 2005; Lukyanov *et al.*, 2005).

Parmi ces PAFPs, il y a des protéines tétramériques, utiles pour le marquage de cellules entières ou d'organelles et des protéines monomériques utilisées pour le suivi de la dynamique d'une protéine. Les PAFPs peuvent être classées en trois groupes selon leur mécanisme de photoactivation (Figure 4).

Les protéines fluorescentes présentent de nombreux avantages : le large choix de couleurs disponibles et leur marquage très spécifique permet une haute sensibilité de détection sans bruit de fond (hormis l'autofluorescence des cellules). Cependant ce sont des protéines d'au moins 220 acides aminés et elles peuvent perturber fortement le repliement, le trafic et la fonction de certaines protéines auxquelles elles sont fusionnées. De plus, les protéines autofluorescentes nécessitent plusieurs heures pour développer leur fluorescence ce qui est trop lent pour certaines applications. Pour ces différentes raisons, il est parfois judicieux d'utiliser un marqueur chimique fluorescent à la place d'une protéine fluorescente.

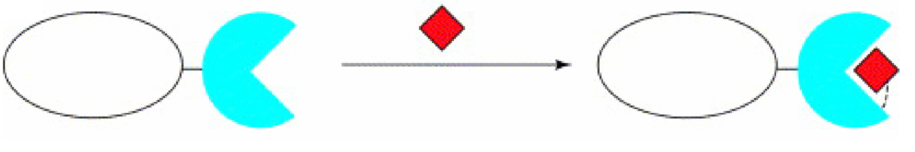


Figure 5. Marquage d'une protéine avec une sonde chimique en utilisant une étiquette protéique. La protéine d'intérêt (ovale blanc) en fusion avec une protéine étiquette (DHFR, hAGT, protéine Halotag ; bleue) est exprimée et est capable de lier de façon covalente ou non une petite molécule (méthotrexate, conjugué O6-benzylguanine ou ligand HaloTag ; losange rouge).
Adaptée de Chen et Ting, 2005.

B. Marqueurs chimiques

Différentes stratégies sont envisageables pour étiqueter une protéine spécifiquement avec une sonde chimique. Il est possible d'utiliser une combinaison unique d'acides aminés, fusionnée à la protéine d'intérêt, qui recrute la petite molécule sonde. Pour certaines méthodes, l'information contenue dans la séquence d'adressage seule est suffisante pour la spécificité, dans d'autres cas, une enzyme est nécessaire pour l'attachement de la sonde à la séquence cible. Une autre approche très différente est d'incorporer des acides aminés non naturels dans la protéine d'intérêt.

D'autres considérations importantes sont à prendre en compte lors d'un marquage *in vivo* d'une protéine. La sonde doit être perméable à la membrane cellulaire et elle ne doit pas être toxique pour la cellule. Le marquage de la protéine doit se faire plus rapidement que les processus biologiques que l'on souhaite étudier et le complexe sonde – protéine doit être suffisamment stable au cours du temps.

Dans les paragraphes suivants, les différentes méthodes de marquage d'une protéine avec une sonde chimique sont discutées. De nombreuses revues décrivent les différentes méthodes et les comparent aux étiquettes protéiques (Chen et Ting, 2005; Giepmans *et al.*, 2006; Johnsson et Johnsson, 2007; Johnsson et Johnsson, 2003; Marks *et al.*, 2004a; Marks et Nolan, 2006; Miller et Cornish, 2005; Zhang *et al.*, 2002).

1) Petites sondes utilisant le ciblage d'une séquence protéique

Dans cette approche, la protéine d'intérêt est exprimée en fusion avec une étiquette protéique qui est capable de lier une petite molécule (Figure 5). Par exemple, la dihydrofolate réductase (DHFR) et le mutant Phe36Val de la protéine 12 de liaison à FK506 (FKBP12(F36V)), se lient respectivement à des petites molécules ligands, le méthotrexate et le SLF' (ligand synthétique pour FKBP12) avec des constantes de dissociation de 25 pM et 94 pM (Clackson *et al.*, 1998; Sasso *et al.*, 1994). La dissociation du ligand peut causer une détérioration du signal au cours du temps. Un autre problème est la présence de DHFR endogène ce qui cause un fort bruit de fond fluorescent à moins d'utiliser des lignées cellulaires mutantes délétées pour la DHFR.

Pour réduire ce problème de perte du signal au cours du temps, de nouvelles sondes ont été développées. Après reconnaissance de l'étiquette protéique et de la sonde, il y a formation d'une liaison covalente. Par exemple, le laboratoire de Johnsson a exploité l'alkylation de la Cys145 de la O^6-alkylguanine transférase humaine (hAGT), aussi connu sous le nom de SNAP-tag, avec de nombreux substrats O^6-benzylguanine pour lier

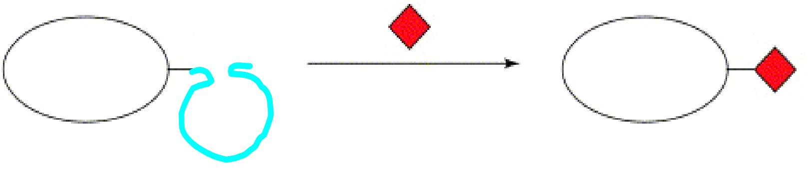


Figure 6. Marquage d'une protéine avec une sonde chimique en utilisant une étiquette protéique excisable. La protéine d'intérêt en fusion à une étiquette protéique (intéine, ubiquitine ; bleue) est exprimée. Après reconnaissance de l'étiquette par la sonde chimique (losange rouge), l'étiquette s'excise ce qui lie de façon covalente la sonde chimique à la protéine d'intérêt.

covalemment des protéines recombinantes avec des fluorophores dans de nombreux types cellulaires (Keppler *et al.*, 2003; 2004a; 2004b). D'autres travaux ont utilisé une séquence protéique d'environ 80 acides aminés dérivée du PCP (peptide carrier protein) (Yin *et al.*, 2004) ou de l'ACP (acyl carrier protein) (George *et al.*, 2004) qui a été étiquetée en utilisant une enzyme, la phosphopantéthéine transférase (PPtase). La PPtase transfert des sondes liées au 4'-phosphopantéthéine depuis le coenzyme A (CoA) à une sérine de la chaine latérale de l'ACP ou de la PCP pour former un attachement spécifique et covalent. Ces deux méthodes ont l'avantage d'avoir des temps de marquages relativement courts (environ 5 - 10 min de marquage et 5 - 10 de lavages). Le développement de sondes fluorogéniques, qui deviennent fluorescentes seulement après la ligation à la séquence cible pourrait encore réduire ces temps de marquages car les étapes de lavages deviendraient inutiles. L'enzyme AGT est trouvé naturellement dans les cellules de mammifères, aussi des enzymes mutantes hAGt ont été générées mais il existe toujours un léger bruit de fond (Juillerat *et al.*, 2003). La méthode PPtase n'a pas ce genre de problèmes mais elle ne peut être utilisée que pour des marquages de protéines à la surface cellulaire car les sondes utilisées ne sont pas perméables à la membrane.

Récemment, un nouveau système est apparu. La protéine HaloTag™ est catalytiquement inactive, c'est une hydrolase génétiquement modifiée qui forme efficacement une liaison covalente avec les ligands HaloTag™. Cette protéine monomérique de 33 kDa est d'origine procaryote et est efficacement exprimée dans différents types cellulaires. Le temps de marquage est relativement court d'environ 3 - 5 minutes (Los *et al.*, 2005).

Avec toutes les méthodes précédemment décrites, le marquage est hautement spécifique. De plus, il est aisé d'adapter la structure des sondes. Par exemple, la nature du fluorophore peut varier ce qui permet d'avoir avec une seule étiquette protéique un large choix de fluorophore en fonction de l'utilisation souhaitée. D'autres ligands non fluorescents comme la biotine peuvent aussi être ajoutés. Le principal inconvénient de ces sondes est leur taille, en effet l'étiquette protéique est parfois presque aussi grande que celle d'une protéine autofluorescente.

Dernièrement, l'utilisation d'intéine et de l'ubiquitine a été envisagée comme séquences d'étiquetage protéique (Figure 6). En effet, les intéines et l'ubiquitine peuvent être clivée « sans trace » depuis la protéine d'intérêt en utilisant l'épissage de protéine ou la déubiquitination pour produire une protéine avec une cystéine en N-terminal. La cystéine N-terminale est ensuite liguée de manière chimiosélective via une ligation chimique native à une sonde fonctionnalisée avec un thioester (Yeo *et al.*, 2003). Cette méthode est versatile et devrait être possible dans tous les types cellulaires mais les

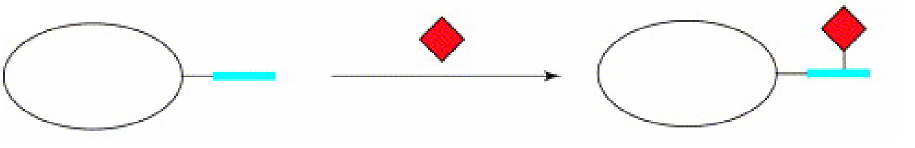


Figure 7. Marquage d'une protéine avec une sonde chimique en utilisant une étiquette peptidique. La protéine d'intérêt est exprimée fusionnée à une étiquette peptidique (His6 ; motif tétracystéine ; bleue), qui est capable de se lier à une petite molécule (fluorophore-Ni-NTA, HisZiFiT ou composé biarsenic fluorogénique ; losange rouge).
Adaptée de Chen et Ting, 2005.

précurseurs des fusions intéine et ubiquitine sont encore gros même s'ils sont temporaires. De plus, les taux de l'épissage ou de la ligation thioester sont lents, restreignant la méthodologie à l'étude de processus biologiques s'effectuant sur plusieurs heures. Enfin les cystéines intracellulaires et les cystéamines sont en compétition avec la protéine cible pour la réaction avec le thioester, réduisant l'efficacité du marquage et nécessitant de nombreux lavages pour réduire le bruit de fond.

2) Petites sondes utilisant le ciblage d'une séquence peptidique

La fusion de séquence peptidique à une protéine d'intérêt présente une option beaucoup moins invasive que la fusion d'une séquence protéique. Comme avec les protéines, de petites molécules peuvent cibler les peptides pour interagir avec une liaison de forte affinité (Figure 7). Par exemple, l'équipe de Nolan a démontré qu'un peptide de 38 acides aminés peut lier le fluorophore Texas-Red avec une constante de dissociation de 25 pM (Marks *et al.*, 2004b). L'équipe de Vogel a montré que des récepteurs membranaires fusionnés avec des polyhistidines (6 à 10) pouvaient être marqués par des chromophores fonctionnalisés avec un motif acide nitrilotriacétique – nickel (Ni-NTA) (Kd = 0,2 - 10 µM) (Guignet *et al.*, 2004). En pratique, l'utilisation de liaison non covalente mène à une détérioration du signal.

L'équipe de Tsien a conçu des composés biarsenics fluorogéniques (FlAsH) capables de se lier à un motif peptitique tetracystéine (Cys-Cys-Pro-Gly-Cys-Cys) (Griffin *et al.*, 1998; 2000). Ces sondes sont perméables à la membrane et deviennent fluorescentes après une liaison de forte affinité (Kd = 2 - 4 pM) à des thiols. L'interaction est assez forte pour tenir sur SDS-PAGE. De nombreuses améliorations des sondes chimiques ont été apportées afin d'apporter un plus grand choix de sondes (Adams *et al.*, 2002). Ces sondes ont été utilisées dans différents types de cellules : cellules de mammifères (Gaietta *et al.*, 2002; Ju *et al.*, 2004; Panchal *et al.*, 2003a), drosophiles (Poskanzer *et al.*, 2003), bactéries (Ignatova et Gierasch, 2004) et levures (Rice *et al.*, 2001). Malgré toutes ces avancées, la méthodologie FlAsH a ses limites. Les composés biarsenics se fixent à des thiols isolés, de nombreux lavages sont alors nécessaires pour éliminer le bruit de fond dû à des interactions non spécifiques même si les sondes sont fluorogéniques (Stroffekova *et al.*, 2001). De plus, malgré l'utilisation d'antidotes dithiols, la toxicité de l'arsenic reste un problème à long terme. La nécessité d'un environnement réducteur pour la fixation du peptide tétracystéine à la sonde biarsenic ajoute des complications techniques pour le marquage.

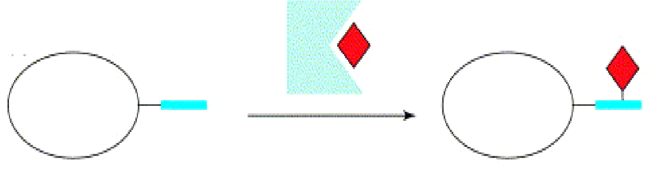


Figure 8. Marquage d'une protéine avec une sonde chimique en utilisant une enzyme pour créer une liaison covalente avec étiquette peptidique. La protéine fusionnée à une étiquette peptidique (peptide accepteur ; bleu) est exprimée. Une enzyme (biotine ligase, cyan) marque l'étiquette peptidique avec la sonde chimique directement ou indirectement.
Adaptée de Chen et Ting, 2005.

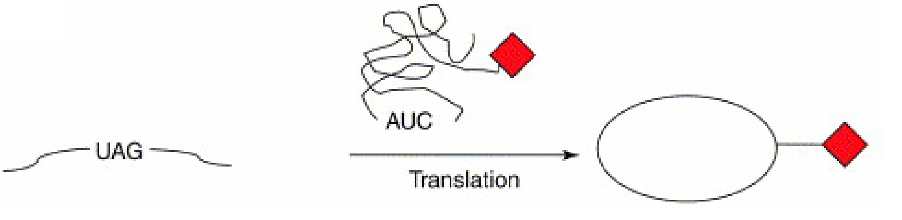


Figure 9. Marquage d'une protéine avec une sonde chimique en utilisant l'incorporation d'un acide aminé non-naturel. Un codon stop ambre (UAG) est introduit dans la séquence codante de la protéine d'intérêt par mutagénèse. Pendant la traduction, un ARNt portant l'anticodon (AUC) qui a été aminoacylé avec un acide aminé non-naturel, supprime le codon stop et permet la production d'une protéine complète contenant l'acide aminé non-naturel.
Adaptée de Chen et Ting, 2005.

Très récemment, l'équipe de Tsien a développé une nouvelle méthodologie appelée HisZiFit pour « Histidine-Zinc *in vivo* Tag » (Hauser et Tsien, 2007). Une fluorescéine modifiée pour chélater deux ions zinc est capable de se lier à une étiquette peptidique de six histidines avec un Kd d'environ 40 nM. Pour le moment, cette sonde permet de marquer seulement les protéines à la surface cellulaire.

L'équipe de Ting a développé une méthodologie pour marquer une séquence peptidique de 15 acides aminés (peptide accepteur ou AP) avec des sondes en utilisant l'enzyme biotine ligase d'*E. coli*, BirA (Figure 8) (Chen *et al.*, 2005). BirA catalyse la ligation de la biotine au peptide accepteur mais des analogues cétones de la biotine peuvent être substitués efficacement à la biotine. Les cétones étant absentes de la surface cellulaire, leurs analogues peuvent être sélectivement fonctionnalisés avec diverses fonctions chimiques. Cette technique combine une liaison covalente, une petite étiquette et une spécificité de marquage mais elle est limitée au marquage à la surface cellulaire et le temps de marquage est de 20 minutes.

3) Incorporation d'acides aminés non naturels

L'utilisation de la mutagénèse pour supprimer le codon ambre afin d'introduire des acides aminés non naturels dans un site d'une manière spécifique a aussi été utilisé pour marquer des protéines dans les cellules vivantes (Figure 9) (Wang et Schultz, 2002). Pour le moment des acides aminés non naturels portant des cétones (Zhang *et al.*, 2003), des azides (Chin *et al.*, 2002), où des alcynes (Deiters *et al.*, 2003) ont été incorporés permettant la dérivatisation en utilisant la formation d'hydrazone, des ligations de Staudinger (Saxon et Bertozzi, 2000) ou des réactions de cycloaddition d'azide/alcyne (Agard *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2003). Récemment, des acides aminés non naturels portant des fluorophores tels qu'un dérivé du Dansyl (Summerer *et al.*, 2006) et de la coumarine (Wang *et al.*, 2006) ont été incorporés. Le principal avantage du marquage avec des acides aminés non naturels sont une spécificité excellente, une versatilité de la sonde chimique et une perturbation structurale minimale de la protéine d'intérêt. Cependant la mutagénèse d'acides aminés non naturels n'est pas applicable à tous les types cellulaires, la plupart des expériences ont été faites dans des bactéries et des levures. Récemment des expériences ont été faites des cellules de mammifères (Hino *et al.*, 2006). Un autre problème est que les ribosomes supportent mal des acides aminés très polaires ou plus gros que le tryptophane ce qui limite donc la structure des sondes à introduire. De plus, de nombreuses protéines tronquées sont générées lors de telles expériences ce qui peut conduire à des artefacts.

Méthodes	Taille étiquette	Spécificité	Restrictions	Autres commentaires
Sonde utilisant une séquence protéique				
DHFR	157	Lie DHFR endogène	Aucune	Dissociation protéine-ligand
FKBP12(F36V)	108	Excellente	Aucune	Dissociation protéine-ligand
hAGT (SNAP-tag)	207	Lie AGT endogène	Aucune	
ACP(PCP)/PPtase	77	Excellente	Protéines à la surface cellulaire	
Intéine/ ligation chimique	~150→1	Compétition avec cystéine endogène	Environnement réducteur	Marquage lent
HaloTag	~300	Excellente	-	
Sonde utilisant une séquence peptidique				
His_6/Ni-NTA	6	Faible pour 6 His mais relativement bonne pour 10 His	Aucune	Dissociation rapide ; Ni^{2+} éteint la fluorescence
His_6ZiFit	6	Excellente	Protéines à la surface cellulaire	
Peptide liant le Texas-Red	23-38	Excellente	Seulement le Texas-Red	Dissociation ligans
Tétracystéine bisarseniée	6-10	Bruit de fond dû à l'affinité avec les monothiols	Environnement réducteur	Fluorogénique ; possibilité de toxicité résiduelle de l'arsenic ; temps longs de marquage
Biotine Ligase/hydrazide	15	Excellent Un substrat naturel dans *E.coli*	Protéines à la surface cellulaire	Deux étapes de marquage
Sonde utilisant une autre méthode				
Incorporation d'acides aminés non naturels	0	Excellente	Non démontré dans tous les types cellulaires	Effet dominant négatif du à des protéines tronquées

Tableau 3. Différentes méthodes pour étiqueter des protéines avec de petites sondes chimiques. Adapté de Chen et Ting, 2005.

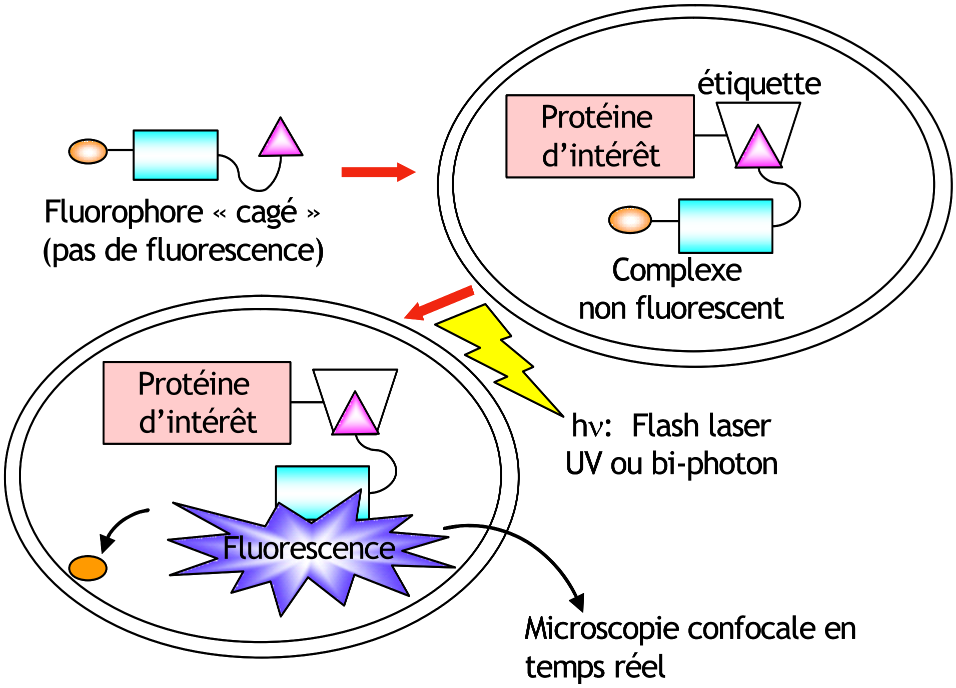


Figure 10. Utilisation d'un fluorophore photoactivable pour suivre la dynamique de protéines intracellulaires. Le rond orangé symbolise la cage, le rectangle bleu le fluorophore et le triangle rose le motif de reconnaissance.

Toutes les méthodologies précédemment abordées pour étiqueter une protéine avec un marqueur chimique dans cette partie sont résumées dans le tableau 3.

VI. Objectifs

L'un des objectifs de ma thèse et en particulier au niveau de la partie chimie a été de développer et synthétiser un nouveau fluorophore photoactivable par UV et par bi-photon capable de reconnaître et de se lier à une étiquette peptidique. Ensuite il était nécessaire de confirmer l'entrée de ce nouveau fluorophore dans des cellules et enfin de l'utiliser pour suivre la dynamique de protéines intracellulaires par microscopie confocale en temps réel (Figure 10). Les différentes stratégies ayant été envisagées sont développées dans les chapitres suivants ainsi que les résultats obtenus.

Chapitre 2.

Résultats et discussion

Chapitre 2. Résultats et discussion

Le « cahier des charges » de ces sondes chimiques photoactivables était particulièrement fourni. En effet, nous voulions développer et synthétiser des fluorophores « cagés » originaux. De plus, la photochimie associée à ces cages devait être rapide et efficace à des longueurs d'ondes appropriées (proche-UV / visible). La photolyse devait être efficace en bi-photons afin de pouvoir choisir plus précisément quelle zone de la cellule serait illuminée. Et bien sur, ces sondes devaient pénétrer efficacement dans les cellules, être non toxiques pour la cellule et finalement devraient être reconnues spécifiquement par une protéine cellulaire.

Une fois satisfait les différents critères requis, ces molécules devraient effectivement permettre de suivre, en temps réel et de manière contrôlée, la dynamique d'une protéine dans une cellule par microscopie en temps réel.

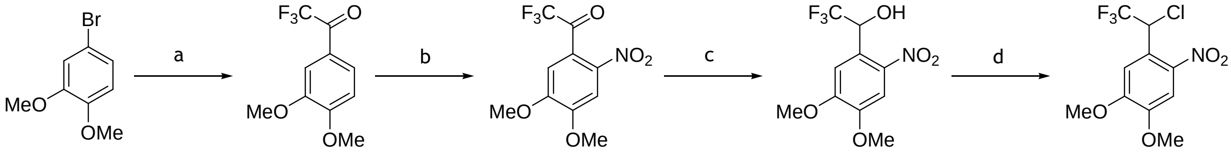
I. Stratégie ReAsH-EDT$_2$ cagé

A. Principe

Au début de ce travail, la stratégie adoptée était la suivante : un groupement photolabile nouvellement conçu au laboratoire : le 1-(4,5-diméthoxy-2-nitrophényl)-2,2,2-trifluoroéthyle (DMNPT) (Specht et Goeldner, 2004) lié a un nouveau fluorophore : le ReAsH-EDT$_2$ pour « Resorufin Arsenical Helix binder, bis-EDT adduct » (Adams *et al.*, 2002). Ce dernier est en fait un dérivé de la résorufine, un analogue phénoxazine de la fluorescéine, modifié par l'addition de deux atomes d'arsenic et d'éthanedithiol (EDT$_2$), ce motif est alors capable de se lier à un motif protéique tétracystéine : -CCXXCC- (ou X correspond à n'importe quel acide aminé). La séquence ayant la meilleure affinité pour lier le ReAsH-EDT$_2$ est –CCPGCC- (Adams *et al.*, 2002). L'avantage de ce fluorophore est qu'il devient fluorescent seulement une fois lié au motif tétracystéine. Ainsi il y a une forte augmentation du rapport signal/bruit. Un des ses inconvénients majeurs est sa potentielle toxicité sur les cellules, en effet pour limiter les effets secondaires dus à des liaisons non spécifiques, il faut toujours ajouter de l'éthanedithiol avec le fluorophore.

B. Synthèses

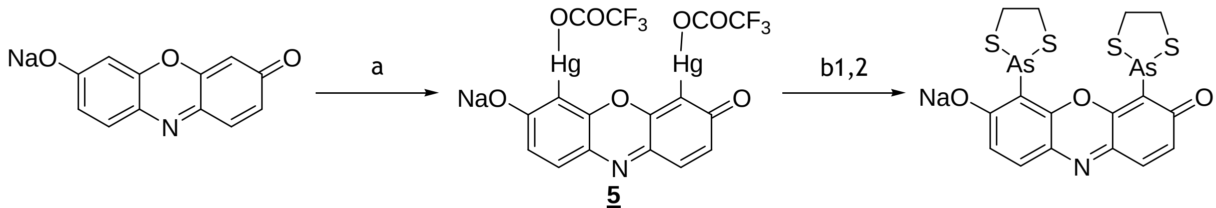
Une synthèse totale convergente a été prévue, c'est dire les synthèses respectives de la cage, et du ReAsH-EDT$_2$ avant condensation. Pour la cage, nous souhaitions utiliser une cage nouvellement décrite au laboratoire (Specht et Goeldner, 2004) dont la synthèse était bien maîtrisée : le 1-choro-1(2-nitro-4,5-diméthoxy)phényl-2,2,2-trifluoroéthyle, DMNPT (composé **4**). Brièvement, le composé **1** est obtenu par réaction d'un aryllithium sur le trifluoroacétate de méthyle. On obtient le composé **3** après une réaction de nitration sélective en position *ortho* par l'acide nitrique à 0°C suivie d'une réduction par NaBH$_4$. Après une réaction de chloration par le chlorure de thionyle, on obtient le composé **4** (Schéma 5).



1 **2** **3** **4**

Schéma 5. Synthèse de la « cage » DMNPT. (a) BuLi, Trifluoroacétate d'éthyle, THF, -78°C ; ρ = 72 %. (b) HNO$_3$, H$_2$SO$_4$, 0°C ; ρ = 41 %. (c) NaBH$_4$, dioxanne ; ρ = 86 %. (d) SOCl$_2$, 50°C ; ρ = 79 %.

Ensuite on voulait greffer ce composé **4** à la résorufine ou à son dérivé bis-arsenié par substitution nucléophile. En revanche, bien que déjà décrite la synthèse du ReAsH-EDT$_2$ (Adams *et al.*, 2002) s'est révélée très délicate. Après mercuration de la résorufine par le trifluoroacétate de mercure, une transmétallation par du trichlorure d'arsenic(III) suivie par une addition d'EDT, le ReAsH-EDT$_2$ devait être obtenu (Schéma 6). Mais le rendement de la réaction relativement faible et des problèmes de purification ne nous ont pas permis d'obtenir le produit final. La molécule semblait relativement instable et le ReAsH-EDT$_2$ n'a pas pu être obtenu. En parallèle, plusieurs tentatives pour greffer la cage directement sur la résorufine ont été essayées sans succès. Il semblerait que la liaison éther ne puisse pas se former. Devant cette impasse, une nouvelle stratégie a du être envisagée.



5

Schéma 6. Synthèse du ReAsH cagé décrite par Adams *et al.*(2002). (a) HgO, TFA. (b)(1) AsCl$_3$, DIEA, Pd(OAc)$_2$, NMP (2) EDT, aq. KHPO$_4$

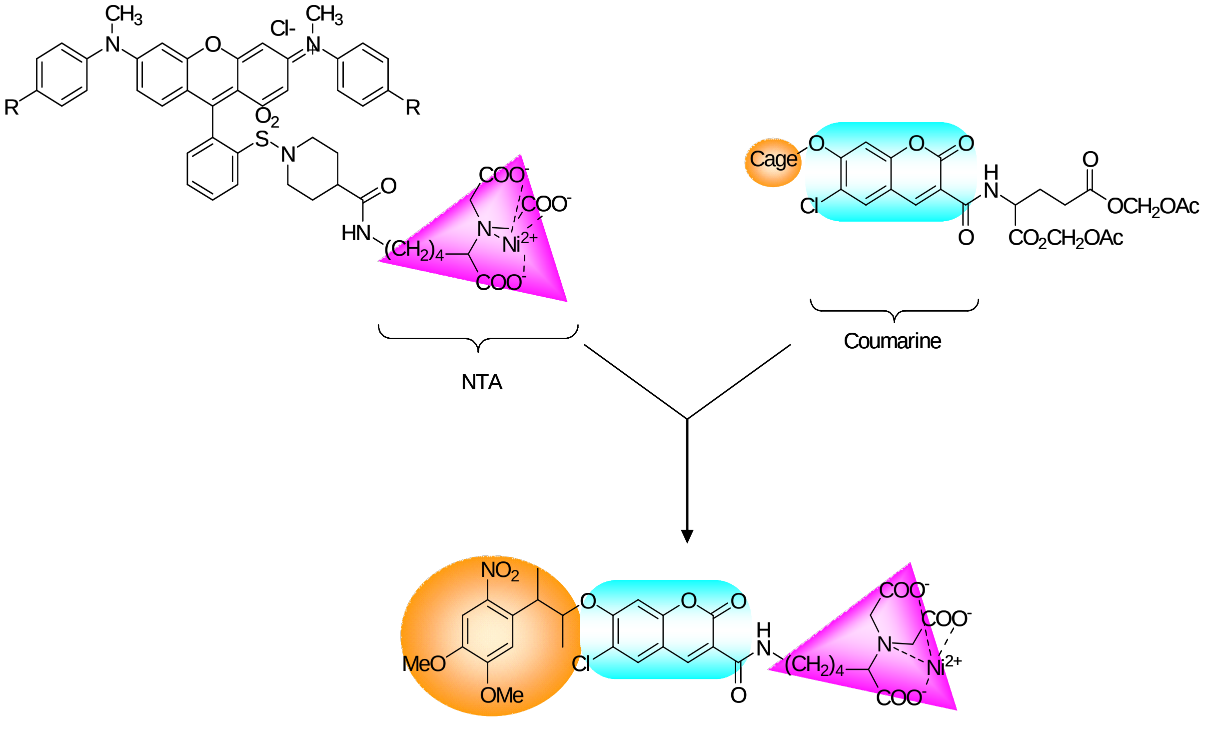


Schéma 7. Stratégie de développement de la sonde

II. Stratégie Coumarine-NTA cagée

A. Principe

A cette période de ma thèse, deux publications nous ont guidés dans le choix de notre nouvelle stratégie. D'une part, la synthèse d'une coumarine photoactivable permettant une libération efficace de la fluorescence après excitation par la lumière UV et en bi-photons a été décrite. Cette coumarine « cagée » est capable de pénétrer facilement dans des cellules HeLa et possède de bonnes propriétés photochimiques résultant d'une propriété de la coumarine, qui peut servir d' « antenne » ce qui augmente l'efficacité de la réaction de photolyse (Zhao *et al.*, 2004). D'autre part, une étude a montré que l'acide nitrilotriacétique (NTA), connu en biochimie pour son interaction en présence de nickel avec une étiquette protéique composée de polyhistidines, peut pénétrer dans les cellules HEK293 lorsqu'il est lié covalemment à un fluorophore (Guignet *et al.*, 2004). Cette interaction, histidines – nickel – NTA, bien que non covalente était suffisamment forte pour faire de l'imagerie sur les cellules. De plus, la spécificité pouvait être augmentée quand l'étiquette protéique était non plus composée de six mais de dix histidines.

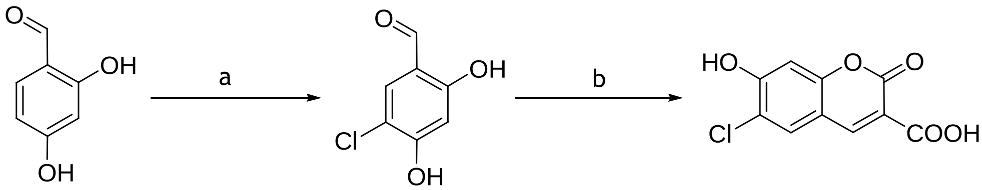
Nous nous proposions alors de combiner ces deux idées pour notre nouvelle sonde (Schéma 7). Elle serait composée d'une nouvelle « cage » mise au point au laboratoire pour masquer la fluorescence, d'une coumarine pour la fluorescence et du système NTA - Nickel - polyhistidines pour la reconnaissance entre cette sonde et la protéine. Cette sonde comporte trois éléments : le groupement photolabile, le fluorophore masqué et finalement le motif NTA-Ni. Pour les études biologiques, nous avions aussi besoin de molécules contrôles. En effet, pour les mises au point des conditions de pénétration cellulaire de notre sonde, il était nécessaire de disposer d'une molécule fluorescente dont la perméabilité à la membrane cellulaire était assurée : une coumarine modifiée par un motif NTA dont les trois groupements acides sont protégés par des esters. Et pour la mise au point du protocole d'entrée dans les cellules d'une molécule portant un groupement NTA, nous avions aussi besoin d'une coumarine greffée à un motif NTA. Pour ces deux molécules, il est indispensable de protéger l'hydroxyle de la coumarine, car à pH physiologique il est sous forme anionique et pourrait empêcher l'entrée dans la cellule. Cet hydroxyle a été protégé en ester acétique car les estérases cellulaires sont capables d'hydrolyser ces esters (Zhao *et al.*, 2004).

B. Synthèses

Une synthèse totale convergente a été réalisée, c'est à dire les synthèses respectives de la cage, du fluorophore et du groupement NTA avant les condensations successives.

1) *Le fluorophore*

La synthèse du fluorophore a déjà été précédemment décrite. Une chloration du 2,4-dihydroxybenzaldéhyde par la N-chloropipéridine (Bui *et al.*, 1990) puis une condensation avec l'acide malonique conduit à la formation du composé **7** (Zhao *et al.*, 2004) (Schéma 8).

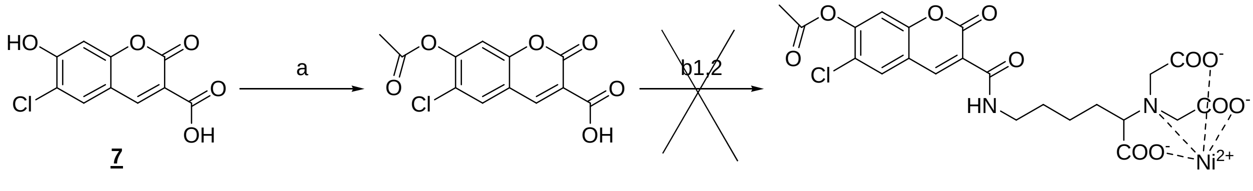


6 7

Schéma 8. Synthèse du composé 7. (a) N-chloropipéridine, acide sulfurique aqueux ; ρ = 77 % (b) Acide malonique, aniline, pyridine ; ρ = 80 %.

2) *Le motif NTA*

La synthèse et le couplage du motif NTA se sont révélés extrêmement délicats du fait de l'insolubilité d'un produit comportant un triacide dans la plupart des solvants organiques. Dans un premier temps nous avons tenté de coupler le composé 7 sous forme d'ester de succinimide avec l'acide N-(5-amino-1-carboxypentyl)iminodiacétique ou « NTA-lysine », donné par le Pr. Horst Vogel de Lausanne selon un protocole précédemment décrit Guignet *et al.* (2004). Brièvement, le « NTA-lysine » chélaté à des ions nickel Ni^{2+} est couplé par l'amine primaire de la chaine latérale de la lysine à un chromophore dont la fonction acide carboxylique est activée par un ester de succinimide, la réaction se faisant en milieu aqueux à pH basique (Schéma 9).



7

Schéma 9. Tentative de synthèse de la coumarine-NTA adaptée de Guignet *et al.* (2004). a) anhydride acétique (1,1 équ.), pyridine (0,1 équ.), dichlorométhane, ρ = 78 %. b)1) NHS (1,3 équ.), DCC (1,3 équ.), THF. 2) « Lysine-NTA » (5 équ.), Acétonitrile / tampon $NaHCO_3$ 50 mM, pH 9,0.

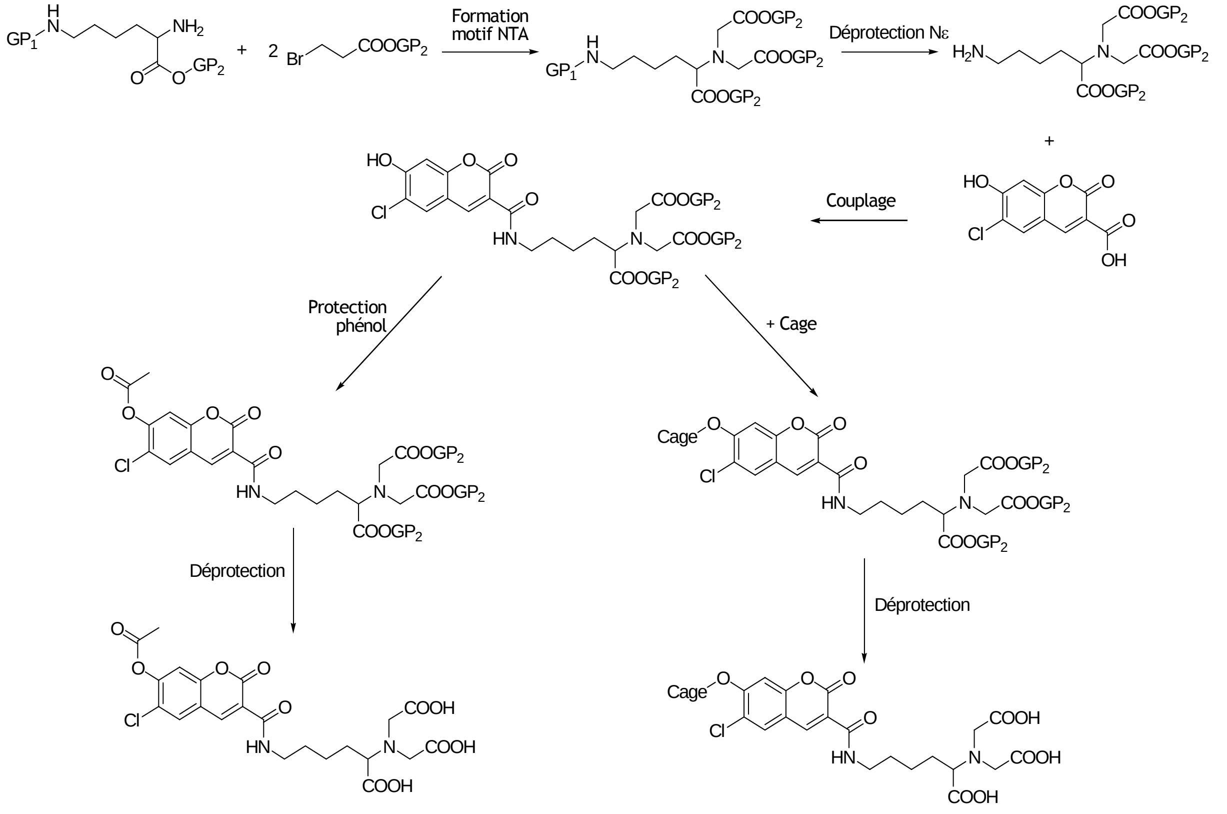


Schéma 10. Stratégie générale de synthèse de la coumarine photoactivable.
GP1 ou 2 = groupe protecteur 1 ou 2

Malheureusement la purification et la caractérisation du produit final étant difficile, je n'ai pas pu confirmer l'obtention du produit désiré. Pour pallier ces problèmes de purification, il fallait protéger le motif triacide par des esters pour pouvoir travailler dans des solvants organiques. L'estérification du motif triacide sur le « NTA-lysine » n'étant pas aisé vu l'insolubilité du produit, il a fallu imaginer une nouvelle stratégie de synthèse (Schéma 10). Nous sommes alors partis de la lysine, un acide aminé comportant une amine primaire en position ε de sa chaine latérale. Le motif NTA étant synthétisé sur l'amine primaire de la chaine principale, il est nécessaire de protéger l'autre amine (GP1). Pour la synthèse du motif NTA, le motif triacide est protégé sous forme d'ester afin d'obtenir un composé soluble dans un solvant organique. Il faut donc choisir un groupement protecteur (GP2) s'enlevant proprement afin d'obtenir un produit final facilement purifiable. Pour finaliser cette synthèse, nous avons du essayer plusieurs couples de groupements protecteurs.

a) Cbz/SEM

Pour le choix des groupes protecteurs des différentes fonctions, dans le but d'optimiser le nombre d'étape de synthèse nous avons opté pour le groupement [2-(triméthylsilyl)éthoxy]méthyl ou SEM (GP2) pour la protection des acides carboxyliques du NTA ; il s'enlève en présence d'ions fluorures. Le carbamate de type carboxybenzyle ou Cbz (GP1) a été choisi pour protéger la fonction amine en position ε de la lysine, ce groupement s'enlevant par hydrogénolyse catalysée par le palladium. La synthèse est présentée dans le schéma 11.

Pour obtenir le motif NTA, deux molécules d'acide bromoacétique ont été substituées sur l'amine primaire de la chaine principale de la lysine (Ho *et al.*, 1998; Hochuli *et al.*, 1987). Ensuite les trois acides ont été estérifiés par le groupement SEM puis l'amine ε a été déprotégée par hydrogénolyse. Ce groupement a alors pu être couplé en position 3 sur le composé **7** après activation de l'acide carboxylique en ester de succinimide en présence de DCC et de DIEA afin de donner une fonction amide (Berthelot *et al.*, 2005). Puis la « cage » ou l'acétate a pu être couplé en position 7 sur le composé **7**. Le composé **13** est obtenu par un couplage de Mitsunobu après activation du DIAD (Diisopropyl-azidocarboxylate) par la triphénylphosphine (Mitsunobu, 1981; Specht et Goeldner, 2004). La coumarine est acétylée avec de l'anhydride acétique. Ensuite il a fallu déprotéger les trois acides en présence d'ions fluorures pour obtenir le composé final. Malheureusement à cette étape nous avons rencontré de nouveaux problèmes de purification. En effet, la déprotection n'était pas totale. De plus pour le composé **12**, une

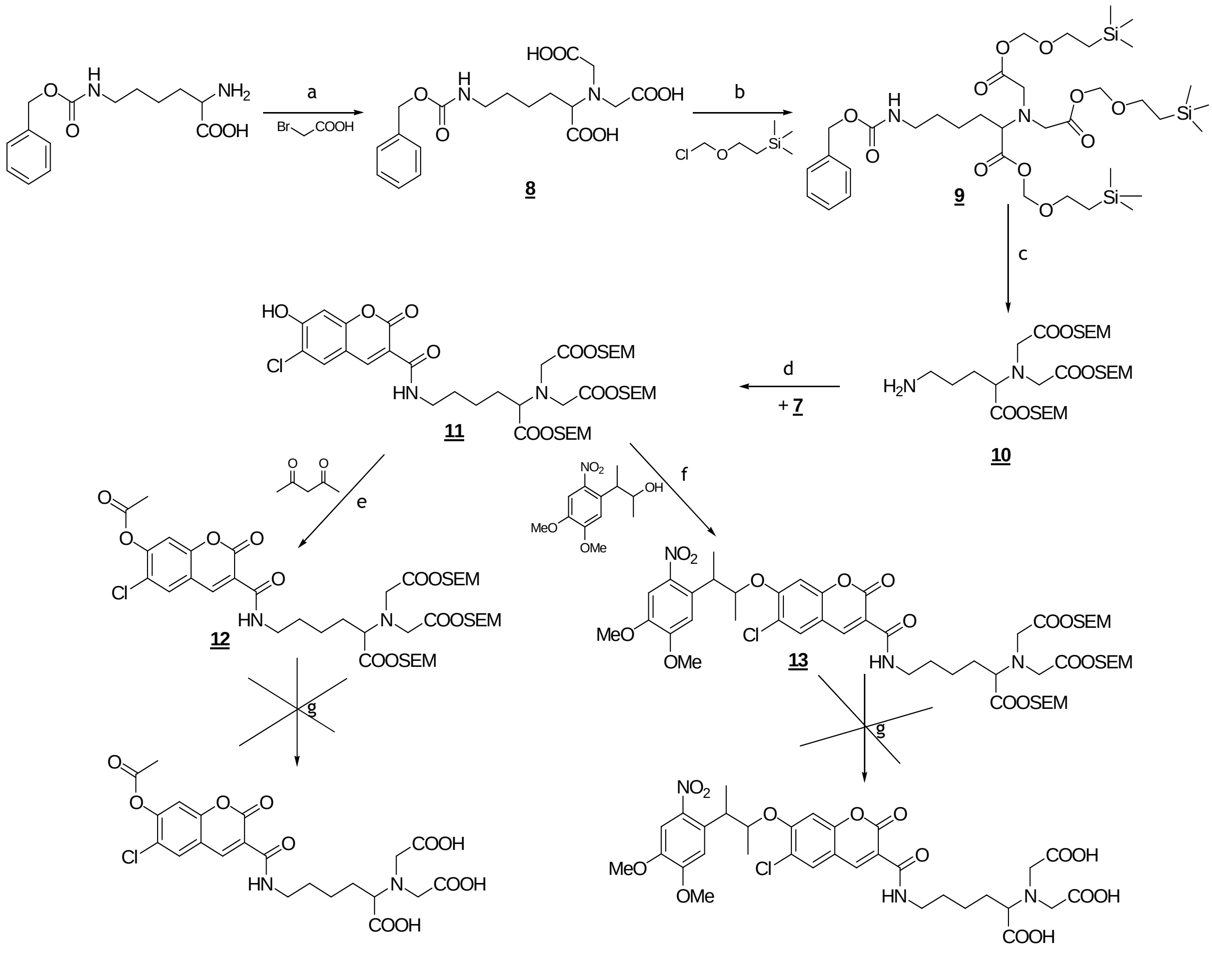


Schéma 11. Stratégie Cbz/SEM

a) NaOH 2 M, 2 h à 0°C, puis une nuit à TA, puis 2 h à 50°C, addition de HCl 1 M ; r = 50 %. b) DIEA, DMF, 1 h à 0°C ; r = 87 %. c) H2, Pd/C, MeOH, 24 h à TA ; r = 98 %. d) NHS, DCC, DIEA, DMF, 2 h à 0°C ; r = 20 %. e) CH2Cl2, une nuit à TA ; r = 80 %. f) PPh3, DIAD, benzène, une nuit à TA ; r = 63 %. g) Bu4NF, THF, une nuit à TA.

hydrolyse de l'acétate a été observée lors de la réaction de déprotection des acides. Comme la purification sur colonne de silice était difficile du fait de la présence des trois acides, nous avons voulu purifier le composé coumarine cagé par chromatographie liquide haute performance (HPLC) sur colonne vydac C18 mais, dans les conditions utilisées (gradient ou mode isocratique), les quatre formes protonées-déprotonées du NTA sont observées ce qui rend difficile une purification. En effet, si le produit correspondant à un pic était purifié, lors de la chromatographie pour vérifier sa pureté, les mêmes quatre pics étaient de nouveau observés. Il a donc fallu concevoir une nouvelle stratégie de synthèse dont l'étape de déprotection finale serait totale et ne libérant pas de sous-produits.

b) Alloc/PMB

Nous avons alors choisi de prendre le couple allyloxycarbonyle (Alloc) (GP1)/ *para*-méthoxybenzyle (PMB) (GP2). Le groupement Alloc permet de protéger les fonctions amines et il peut être enlevé par le tetrakis(triphénylphosphine)palladium(0) (Dangles *et al.*, 1987). Le *para*-méthoxybenzyl ester, lui, protège les fonctions hydroxyles et nous voulions l'utiliser pour protéger les fonctions acides carboxyliques. Il se déprotège par une hydrolyse acide avec du TFA / anisole (Stewart, 1968). Mais cette stratégie (Schéma 12) s'est révélée inefficace. En effet, il était possible de protéger seulement deux des trois fonctions acides du motif NTA. Le troisième acide ne doit pas être accessible, ceci peut s'expliquer par une plus grande gêne stérique des trois groupements PMB par rapport au trois groupements SEM. Nous étions de nouveau confrontés au choix d'un nouveau couple de groupements protecteurs.

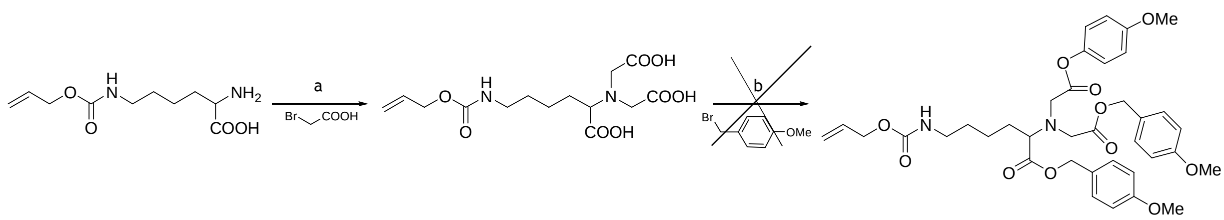


Schéma 12. Stratégie Alloc/PMB

a) NaOH 2 M, 2 h à 0°C, puis une nuit à TA, puis 2 h à 50°C, addition de HCl 1 M ; ρ = 50 %. b) TEA, DMF, 0°C puis une nuit à TA.

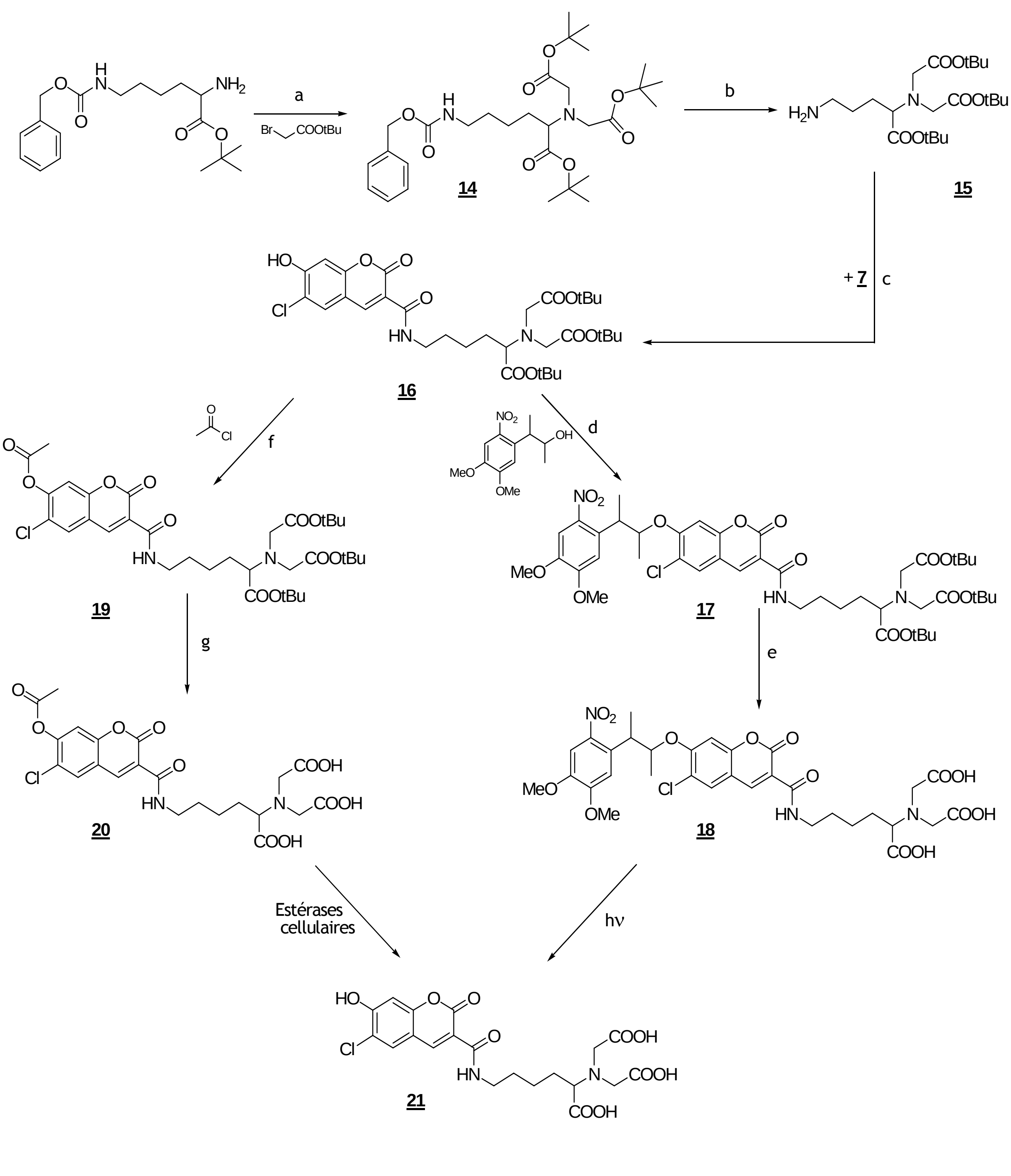


Schéma 13. Stratégie Cbz/tBu

a) DIEA, DMF, une nuit à 55°C ; r = 98 %. b) H2, Pd/C, MeOH, 24 h à TA ; r = 98 %. c) NHS, DCC, DIEA, DMF, 2 h à 0°C ; r = 45 %. d) PPh3, DIAD, benzène, une nuit à TA ; r = 65 %. e) TFA, CH2Cl2, 4 h à TA ; r = 93 %. f) TEA, CH2Cl2, 0°C puis 1 h à TA ; r = 87 %. g) TFA, CH2Cl2, 5 h à TA ; r = quantitatif.

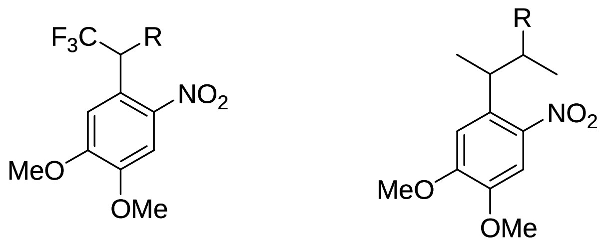
c) Cbz/tBu

Nous avons alors choisi de nouveau le groupement Cbz (GP1) pour protéger la fonction amine et le groupement *tert*-butyle (tBu) (GP2) pour les fonctions acides carboxyliques. Celui-ci peut être facilement enlevé par l'acide trifluoroacétique (TFA) dans du dicholorométhane.

La construction du motif NTA a été faite comme décrit par (Dorn *et al.* (1998) et Lata *et al.* (2005). Brièvement, le *tert*-butyl Nε-benzyloxycarbonyl-L-lysine est alkylé deux fois par le bromoacétate de *tert*-butyle en position Nα de la lysine. Après hydrogénolyse, le composé **15** est obtenu. Il est alors couplé au composé **7** comme décrit précédemment puis à la « cage » par un couplage de Mistunobu (Mitsunobu, 1981) ou la coumarine est acétylée comme décrit précédemment. Puis les trois acides sont déprotégés avec de l'acide trifluoroacétique. Et cette fois-ci la déprotection était propre (Schéma 13).

3) Les cages

Nous nous proposions d'utiliser le groupement photolabile précédemment décrit : le composé **4** (Schéma 14) (Specht et Goeldner, 2004) (cf section I de ce chapitre). Cependant, après bien des essais, nous n'avons pas pu obtenir le dérivé diazoéthane nécessaire pour réagir avec la fonction phénol de la coumarine. Par la suite, cette nouvelle cage s'est révélée être d'un intérêt limité étant donné la faible stabilité hydrolytique. Nous avons alors choisi de coupler une nouvelle cage développée et synthétisée au laboratoire par le Dr. Alexandre Specht (Schéma 14) (Specht *et al.*, 2006). Pour coupler cette nouvelle cage à la coumarine, un couplage de Mitsunobu (Mitsunobu, 1981) a été effectué. On obtient alors le composé cagé désiré avec un rendement acceptable de 65 %. Pour la synthèse du composé **18** nous avons utilisé l'énantiomère *thréo* de la cage (Specht *et al.*, 2006).



Cage DMNPT (Composé **4**) — Cage DMNPB

Schéma 14. Groupements photolabiles du laboratoire
DMNPT : 1-(4,5-diméthoxy-2-nitrophényl)-2,2,2-trifluoroéthyle
DMNPB : 3-(4,5-diméthoxy-2-nitrophényl)-2-butyle

C. Propriétés photochimiques

1) *Propriétés photophysiques*

Nous avons étudié les propriétés de fluorescence des composés **16**, **21** et **18**. Les résultats sont résumés dans le tableau 4.

	Composé **16**/**21**	Composé **18**
λ_{max} excitation	408 nm	355 nm
ε ($mol^{-1}.cm^{-1}$)	25 000	15 000
λ_{max} émission	450 nm	/
Rendement quantique de fluorescence (ϕ_f)	0,95	<0,009
Rendement quantique de photolyse à 350 nm (ϕ)	/	0,26
Temps de demi-vie de la réaction de photolyse ($\tau_{½}$)	/	4 µs
Section efficace en bi-photon à 740 nm	/	0,21 GM

Tableau 4. Propriétés photophysiques de la coumarine et ses dérivés dans un tampon phosphate à pH 7,4.

Ainsi comme nous l'attendions, le composé **18** n'est pas fluorescent. La réaction de photofragmentation peut se faire dans le proche UV (355 nm) et à des longueurs d'onde où l'on n'excite pas ou peu le composé **21**. De plus, le composé **20** n'est pas fluorescent et ne devrait donc pas gêner l'observation dans les cellules.

2) *Réaction de photofragmentation*

La réaction de photolyse (Schéma 15) a été analysée pour sa qualité, son efficacité ainsi que du point de vue cinétique.

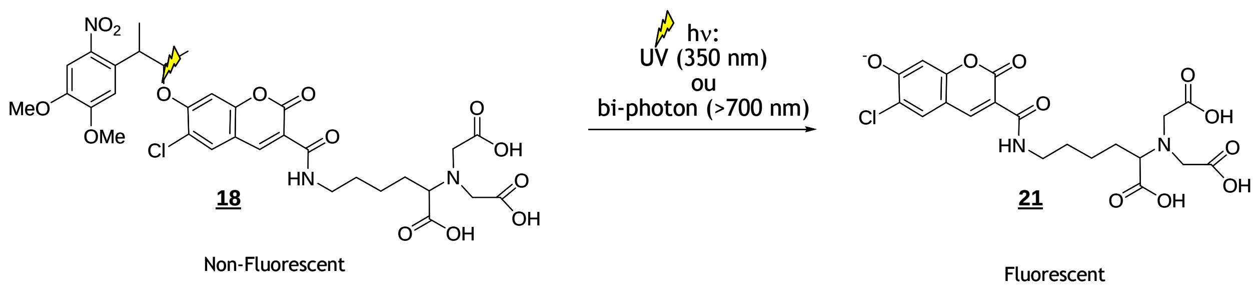


Schéma 15. Réaction de photofragmentation

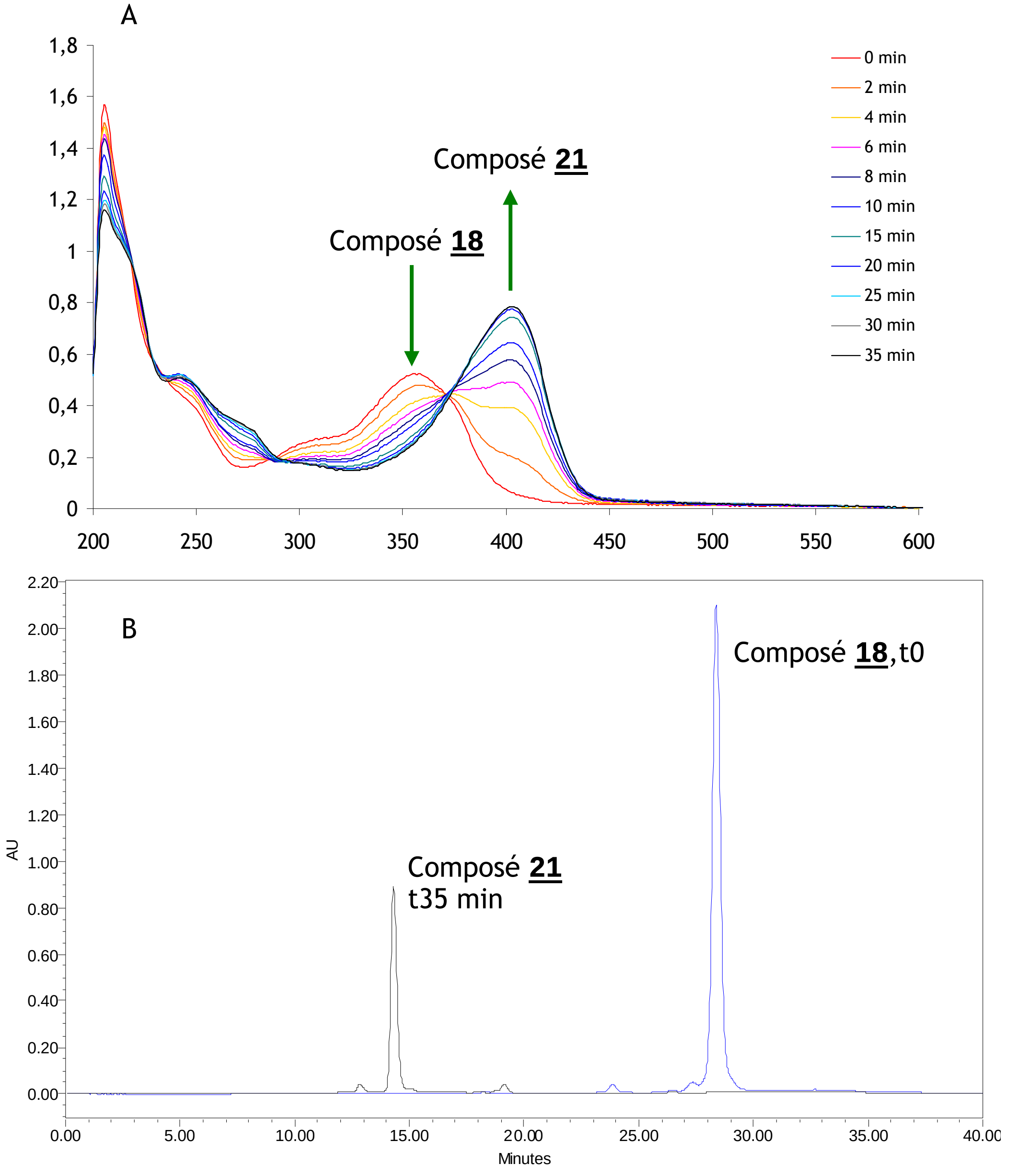


Figure 11. Suivie de la réaction de photofragmentation. L'irradiation du composé **18** a été faite pendant 35 minutes à une longueur d'onde de 364 nm. A, Suivi de la réaction de photofragmentation par spectrométrie. B, Analyse du composé **18** à t0 et après 35 minutes d'irradiation par HPLC. Gradient linéaire sur 30 min de 0 à 100 % d'acétonitrile dans une solution aqueuse de TFA à 0,1 % puis mode isocratique pendant 10 min avec 100 % d'acétonitrile.

L'irradiation du composé **18**, dans un tampon PBS à pH 7,4 à 315 nm, 365nm et à 403 nm à l'aide d'une lampe au mercure, montre que la réaction de photofragmentation est propre après analyse des spectres UV enregistrés à différentes longueurs d'onde d'irradiation. Une diminution de l'absorbance à 355 nm est concomitante avec l'apparition d'une absorbance à 408 nm et un point isobestique apparaît vers 375 nm ce qui témoigne d'une photofragmentation propre (Figure 11). L'analyse par HPLC a permis de confirmer que l'irradiation du composé **18** s'accompagne d'une diminution graduelle de ce dernier en fonction du temps d'exposition, avec l'apparition concomitante d'un dérivé de la coumarine fluorescent et d'un sous-produit de la « cage » (visualisés par UV). La qualité est établie par un dosage du dérivé de la coumarine à 408 nm, la réaction de photolyse est quasiment totale (> 95% de coumarine libérée après photolyse).

De plus sur un microscope confocal, quand une solution non fluorescente du composé **18** est irradiée par une lampe UV, on observe une augmentation de la fluorescence dans le bleu dont le spectre d'émission correspond au spectre de fluorescence de la coumarine.

L'efficacité d'une réaction de photolyse se caractérise par le produit Φ x ε (rendement quantique de photolyse x coefficient d'extinction molaire à la longueur d'onde d'irradiation). Le rendement quantique a été estimé à 0,26 à partir du glutamate cagé avec le même groupement photolabile (Specht *et al.*, 2006). Associé à un ε élevé à 364 nm, cela conduit à une efficacité photolytique remarquable.

Les cinétiques de photofragmentation sur le composé **18** ont été réalisées dans le laboratoire du Dr. J. Wirz à Bâle. Ces cinétiques ont consisté à analyser la formation d'un dérivé de la coumarine après flash laser (350 nm). La demi-vie de libération du produit a été calculée à ~ 4 μs. Nous sommes donc en présence d'une photofragmentation très rapide, largement compatible avec les études de dynamique de protéines.

La détermination de la section efficace en bi-photon du composé **18** a été effectuée par le Dr. T. Furuta à Tokyo. La valeur trouvée à 740 nm est de 0,21 GM, ce qui confère au composé **18** une sensibilité faible mais satisfaisante à la photolyse bi-photonique. De plus, nous avons irradié ce composé en solution avec un laser pulsé utilisé pour le bi-photon à 740 nm et on observe une augmentation de la fluorescence en fonction du nombre de flash.

L'ensemble des propriétés photochimiques sont bonnes voire excellentes et permettent d'envisager l'utilisation de cette sonde pour les études de dynamique de protéines intracellulaires.

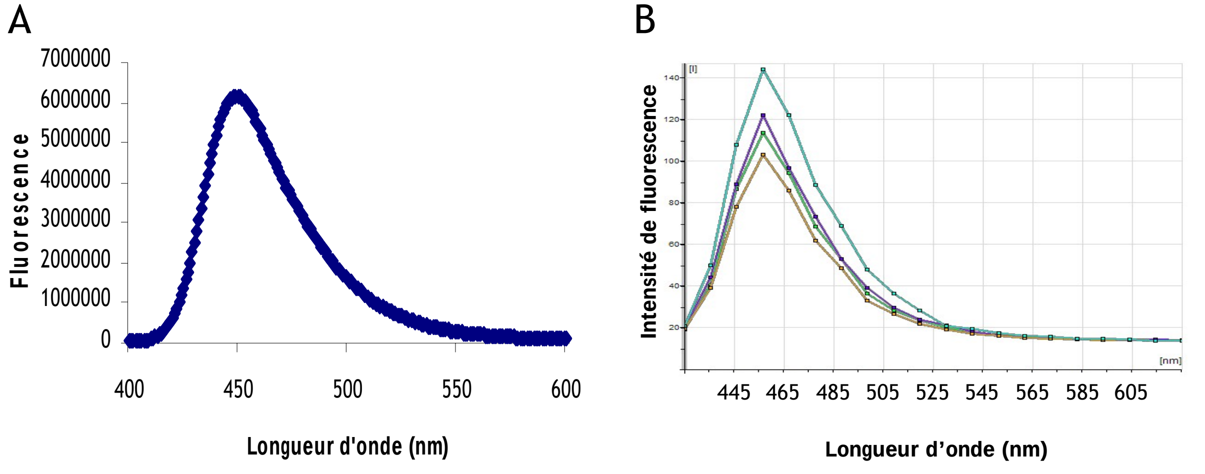


Figure 12. Spectres d'émission des dérivés de coumarine. A, Spectre d'émission mesurée par fluorimétrie (excitation à 410 nm) du composé **18** en solution. B, Spectres d'émission mesurés par microscopie confocale (excitation à 405 nm) des composés **19** et **22** après leur entrée dans le cytoplasme de cellules. Les courbes sont représentatives de l'émission de fluorescence observée dans différentes zones d'une cellule et sont similaires pour les composés **19** et **22**.

D. Tests cellulaires

Avant d'étudier le problème de reconnaissance et de dynamique de protéines intracellulaires, il nous fallait établir un certain nombre de contrôles : l'entrée du composé **20(Ni^{2+})** dans les cellules, puis sa liaison à une protéine possédant une étiquette polyhistidines, la non-toxicité des composés **18**, **20(Ni^{2+})** et du sous-produit libéré dérivé de la coumarine, la photofragmentation du composé **18** et la non-toxicité des sous-produits.

Pour faire nos tests sur des cellules, nous avons choisi les cellules HeLa, car elles sont relativement résistantes et faciles à transfecter et à maintenir en culture. Elles nous sont fournies par la plateforme de culture cellulaire à l'IGBMC, Strasbourg. Toutes les expériences nécessitant un microscope ont été réalisées avec l'aide de Pascal Kessler à la plateforme d'imagerie cellulaire de l'IGBMC dirigée par Jean-Luc Vonesch.

1) Entrée cellulaire

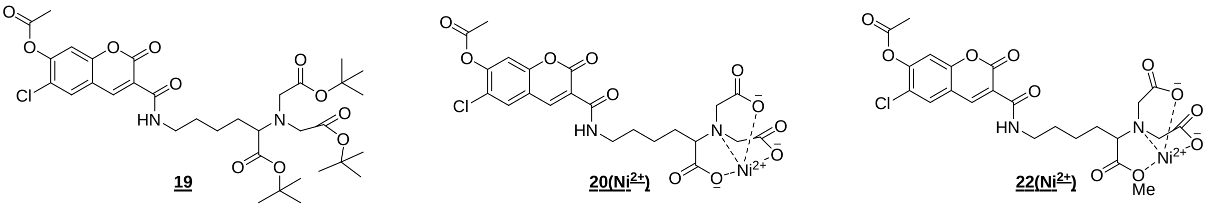


Schéma 16. Structure des composés 19, 20(Ni^{2+}) et 22(Ni^{2+})

Pour la mise au point des conditions d'entrée dans les cellules, nous avons utilisé le composé **19** (Schéma 16). En effet, cette molécule est facilement perméable à la membrane cellulaire du fait de la présence des trois tBu bien qu'elle soit plus difficile à solubiliser dans un milieu aqueux que son dérivé déprotégé. Les cellules sont préalablement mises en culture sur des lamelles de verre découpées en plusieurs puits ce qui permet d'observer les cellules vivantes. Les cellules sont incubées à 37°C avec La molécule dans du tampon HBSS pH 7,35 à une concentration finale de 1 µM pendant 30 minutes. Après plusieurs lavages, celles-ci sont alors observées au microscope équipé d'un objectif X 63 et d'une platine chauffante (37°C). Une forte fluorescence est observée dans pratiquement tout le cytoplasme cellulaire (excitation à 405 nm, fenêtre d'émission de 410 à 510 nm), ce qui signifie que la molécule a pénétrée dans la cellule (Figure 13 A). Sur le microscope confocal utilisé, il est possible de faire un spectre d'émission ce qui nous permet de vérifier que le spectre obtenu avec un pic à 456 nm correspond bien à celui

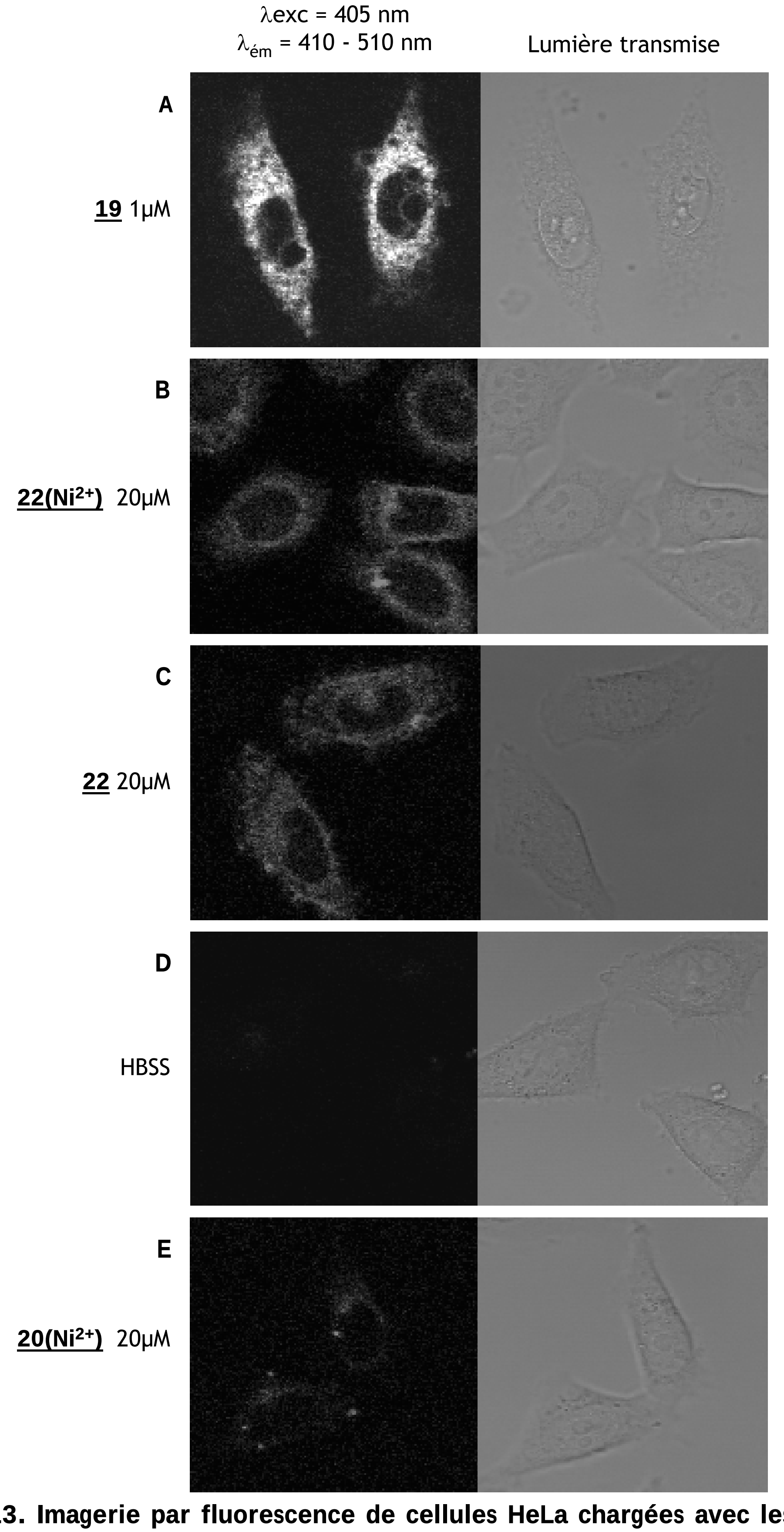


Figure 13. Imagerie par fluorescence de cellules HeLa chargées avec les composés <u>19</u>, <u>20(Ni^{2+})</u> <u>22</u> et <u>22(Ni^{2+})</u>. Les cellules sont chargées avec 1 µM du composé **<u>19</u>**, 20 µM des composés **<u>20</u>**, **<u>22</u>** et **<u>22(Ni^{2+})</u>** pendant 30 minutes dans du tampon HBSS pH 7,35 à 37°C. Après lavages, la fluorescence des cellules est observée au microscope avec une excitation à 405 nm.

d'un dérivé de la coumarine (Figure 12). Ceci montre aussi que le composé **20(Ni^{2+})** (Schéma 16), non fluorescent, est rapidement hydrolysé par les estérases cellulaires. Il est à noter que le noyau n'est pas fluorescent ce qui suggère que l'acétate ayant été hydrolysé, une charge négative est apparue sur le composé **18** libéré par l'action des estérases cellulaires sur le composé **19** ce qui l'empêcherait alors de traverser la membrane nucléaire.

Une fois les conditions d'entrée ayant été mises au point avec le composé triester : cellules incubées 30 minutes à 37°C avec le composé dilué dans du tampon HBSS, nous avons fait les mêmes expériences avec le composé **20(Ni^{2+})**. La figure 13 E montre une absence de fluorescence dans le cytoplasme ce qui signifie que le composé n'a donc pas réussi à traverser la membrane plasmique. Ceci ne correspond pas à ce qui a été montré dans la littérature (Guignet *et al.*, 2004). Le nickel Ni^{2+} est indispensable pour la liaison entre une étiquette polyhistidines et le NTA or il porte deux charges positives et le motif NTA peut posséder jusqu'à trois charges négatives selon le pH. Le fait que le composé **20(Ni^{2+})** ne rentre pas dans les cellules suggère qu'une charge négative serait encore libre. Pour vérifier cette hypothèse, David Puliti, un doctorant du laboratoire, a synthétisé un nouveau chélatant du Ni^{2+}, la « coumarine-NDA » (composé **22(Ni^{2+})**, Schéma 16) dont un des acides est protégé sous forme d'ester méthylique. Pour obtenir cette molécule, il est parti de la méthyl-Nε-benzyloxycarbonyl-L-lysine et a procédé comme précédemment décrit en utilisant le tBu comme deuxième groupe protecteur. Nous avons choisi l'ester méthylique comme groupe protecteur car il devrait être plus résistant que les esters *tert*-butyliques et ne pas s'enlever lors de l'étape de déprotection de ces derniers. De plus, l'ester méthylique pourrait être hydrolysé par les estérases cellulaires, ainsi, une fois entré dans le cytoplasme cellulaire, le NTA serait généré. Une fois cette molécule obtenue et chélatée avec du nickel, nous avons testé son entrée dans les cellules. Après une incubation de 30 minutes avec les cellules, celles-ci deviennent fluorescentes lorsqu'on les excite à 405 nm (Figure 13 B) et le spectre d'émission correspond à celui de la coumarine. Alors que la concentration finale du composé **22(Ni^{2+})** est de 20 µM, l'intensité de fluorescence observée dans le cytoplasme cellulaire est moindre que celle observée avec le composé **19** à une concentration de 1 µM avec des paramètres d'observation identiques. Ceci suggère que les conditions d'entrée dans les cellules sont encore à améliorer mais elles sont toutefois suffisamment importantes pour faire de l'imagerie cellulaire dans de bonnes conditions d'observations. Nous avons aussi observé une chose surprenante : le composé **22(Ni^{2+})** rentre dans les cellules avec ou sans chélation par le nickel (Figure 13B et C). Nous n'avons pas d'explication à cette constatation si ce n'est la possibilité que des cations divalents du tampon (Mg^{2+}, Ca^{2+}) se substituent au nickel.

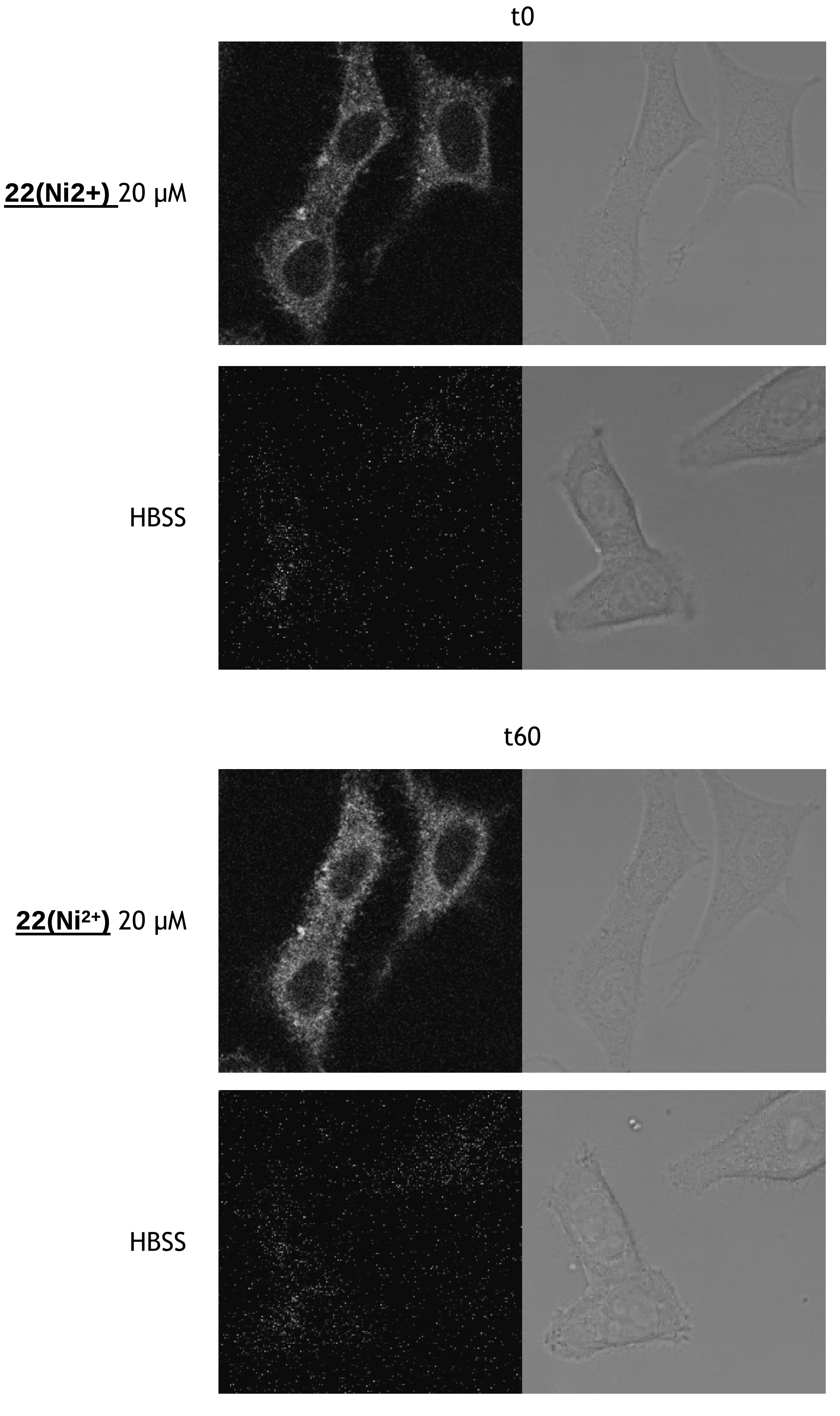


Figure 14. Tests par imagerie de fluorescence de la toxicité du composé <u>22(Ni^{2+})</u> chargé dans les cellules HeLa. Les cellules sont chargées avec 20 µM du composé **<u>22(Ni^{2+})</u>**, pendant 30 minutes dans du tampon HBSS pH 7,35 à 37°C. Après lavages, la fluorescence des cellules est observée toutes les 10 secondes pendant 1 h au microscope avec une excitation à 405 nm.

2) *Toxicité cellulaire*

Le composé **<u>22(Ni^{2+})</u>** est donc capable de rentrer dans les cellules ; il faut maintenant établir si cette molécule est cytotoxique. Nous avons fait un test par microscopie : les cellules chargées ou non avec le composé **<u>22(Ni^{2+})</u>** ont subi de nombreuses irradiations sur un temps court (10 min, 200 irradiations à 405 nm) ou plus long (1 h, 370 irradiations à 405 nm) et nous avons pu observer qu'elles résistent bien à ces nombreux flashs en effet aucune différence notable de fluorescence n'est visible avant et après irradiation (figure 14). Donc le composé, dans des conditions optimales pour faire de l'imagerie, ne semble pas toxique pour les cellules sur des temps largement suffisants pour observer le mouvement du cytosquelette d'actine.

Chapitre 3.

Perspectives

Chapitre 3. Perspectives

Ce projet de thèse était de réaliser le développement d'un nouveau fluorophore photoactivable capable de se lier de façon spécifique à toute protéine d'intérêt, dans le cas de ce projet les protéines régulant le cytosquelette d'actine. Afin d'atteindre ce but, plusieurs stratégies de synthèse ont été envisagées. Une première stratégie basée sur le fluorophore ReAsH, capable de lier des protéines étiquetées avec un motif-CCPGCC-(Adams *et al.*, 2002), a été tentée sans succès. En effet, la synthèse et la caractérisation de ce fluorophore se sont révélées délicates. Il semblerait que le composé ReAsH ne soit pas stable pendant les étapes de purification. De plus, malgré de nombreuses tentatives, il ne m'a pas été possible d'obtenir une résorufine couplée à un groupement photolabile. Dans la littérature, une résorufine iodoacétate « cagée » a été décrite (Theriot et Mitchison, 1991). Le précurseur du groupement photolabile était le 1-(2-nitrophényl)diazoéthane ; or à ce moment du projet, la « cage » que nous voulions greffer était le 1-choro-1(2-nitro-4,5-diméthoxy)phényl-2,2,2-trifluoroéthyle (composé **4**) car la synthèse du dérivé diazoéthane correspondant est très difficile. Malgré de nombreuses tentatives de couplage via des réactions de substitution nucléophile entre la résorufine et le composé **4**, le produit désiré n'a pas été obtenu. Il semble donc qu'une réaction de substitution nucléophile soit difficile à mettre en place pour obtenir un dérivé *O*-alkyl de la résorufine.

Ces essais infructueux m'ont conduite à adopter une nouvelle stratégie qui s'appuie sur des travaux récents (Guignet *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2004) : une coumarine photoactivable ayant un motif Ni-NTA capable de lier des protéines étiquetées avec des polyhistidines. Après plusieurs tentatives de synthèse en utilisant divers groupes protecteurs, différentes « cages » du laboratoire, nous avons finalement obtenu le composé **18**. Avant d'effectuer des tests de pénétration de ce composé dans le cytoplasme cellulaire, nous avons utilisé le composé **20**, un dérivé du composé **18** où la coumarine est acétylée et non « cagée ». En effet, le pKa du phénol de la coumarine chlorée est d'environ 5,5 ce qui signifie qu'au pH physiologique (pH 7,4) ce groupement est sous forme anionique donc il est nécessaire de masquer cette charge (Zhao *et al.*, 2004). Le dérivé acétylé de la coumarine n'est pas fluorescent, mais une fois hydrolysé par les estérases cellulaires, il le devient. C'est le même principe que lorsqu'on ajoute une « cage » mais dans ce cas là, la libération de la fluorescence n'est pas contrôlée. Une fois ce composé **20** obtenu, les tests sur les cellules ont pu commencer, en effet il est plus facile de mettre au point des conditions d'entrée d'un composé s'il est fluorescent. Nous nous sommes alors rendus compte que ce composé, préalablement chélaté à des ions Ni^{2+}, ne semblait pas pénétrer dans les cellules aux doses testées (2 et 20 µM) alors que le composé **19**

correspondant au composé **18** avec les trois acides du groupement NTA protégés par des *t*-butyles pénètre facilement dans les cellules. En effet après 5 minutes d'incubation avec des cellules HeLa, à une concentration de 1 µM, une forte fluorescence bleue, avec un spectre d'émission semblable à celui de la coumarine en solution, est observée dans le cytoplasme. Ceci signifie donc que le problème d'entrée dans les cellules provient de la charge restante sur le groupement NTA, les deux autres charges étant masquées par chélation avec le nickel. Ces résultats sont en désaccord avec les travaux de Guignet *et al.* (2004) dans lesquels, un « quencher » de fluorescence lié au NTA, chélaté au nickel, serait capable de marquer un récepteur membranaire, le récepteur 5HT3, dont une des boucles intracellulaires possède une séquence polyhistidine, ce qui signifie que le fluorophore-Ni-NTA est capable de passer la membrane cellulaire. En fait, peu de travaux sur l'utilisation du Ni-NTA pour marquer des protéines sur des cellules vivantes sont connus. Ceux de Goldsmith *et al.* (2006) décrivent la fixation d'un fluorophore, la fluorescéine, possédant un motif NTA, chélaté au nickel, sur des séquences polyhistidines de protéines extracellulaires. Comme nous voulions vérifier que le problème d'entrée dans les cellules du composé **20(Ni^{2+})** provenait de la charge restante, David Puliti a synthétisé le composé **22(Ni^{2+})** où l'acide provenant du précurseur lysine est méthylé, ainsi les deux acides restant sont chélatés par le nickel et les charges sont neutralisées. Nous partions du postulat que le motif acide nitrilodiacétique (NDA) fixerait le nickel avec une affinité suffisamment forte pour passer la membrane cellulaire, le troisième acide étant libéré dans le cytoplasme grâce aux estérases cellulaires et le motif Ni-NTA généré pouvant alors se fixer à une protéine avec une étiquette polyhistidine. Nous avons alors observé que le composé **22(Ni^{2+})** est capable de pénétrer dans des cellules HeLa ce qui cause une forte augmentation de la fluorescence dans le cytoplasme cellulaire. Etrangement, ce composé est aussi capable de rentrer dans les cellules sans chélation au nickel. Nous devons vérifier que le nickel est effectivement chélaté au motif NDA. Pour faire cela, il nous faudrait une protéine intracellulaire, de localisation connue, fusionnée avec une polyhistidine pour vérifier que le marquage avec le composé **22(Ni^{2+})** est correct. On pourrait, par exemple, utiliser l'actine, en effet celle-ci a été étiquetée avec un SNAP-tag et visualisée dans des cellules NIH3t3 (http://www.covalys.com/applications/other-applications.html) et il serait alors possible de comparer les résultats et confirmer que le Ni-NDA est capable de se lier à une Actine-His alors que le NDA seul ne devrait pas être capable de le faire. Il pourrait aussi être judicieux d'étudier le mécanisme d'entrée dans les cellules du NDA. En effet, s'il entre par diffusion passive ou par endocytose les mécanismes cellulaires mis en jeu ne sont pas les mêmes et cela pourrait peut être expliqué le fait qu'il entre avec ou sans chélation au nickel.

Il faut noter que l'inconvénient majeur de la coumarine, ce sont ses longueurs d'ondes de fluorescence (excitation : λ_{max} = 410 nm et émission : λ_{max} = 450 nm). En effet, à ces longueurs d'onde très proches de l'UV, une forte autofluorescence cellulaire est parfois observée pouvant empêcher la détection des signaux les plus faibles. C'est pourquoi de nouveaux fluorophores, basés sur la coumarine mais ayant des longueurs d'excitation et d'émission déplacées vers le vert, sont en cours de développement au laboratoire. Une autre solution serait d'utiliser la résorufine qui a l'avantage d'émettre de la fluorescence dans le rouge (excitation : λ_{max} = 570 nm et émission : λ_{max} = 585 nm à pH 9) et qui devrait pouvoir être « cagée » plus facilement avec le groupement DMNPB en utilisant un couplage de Mitsunobu (Specht *et al.*, 2006).

D'autre part, nous avons testé les propriétés photochimiques du composé **18.** Premièrement nous avons vérifié que l'ajout de la « cage » sur le phénol masque efficacement la fluorescence de la coumarine par la détermination du rapport des rendements quantiques de fluorescence avant et après photolyse (environ 100 fois supérieur après photolyse). Puis nous avons étudié la réaction de photolyse pour sa qualité, son efficacité ainsi que du point de vue cinétique et nous avons déterminé la section efficace du composé **18** en bi-photon. Il est à noter que le rendement quantique de photolyse a été déterminé sur un glutamate « cagé » et non directement sur la coumarine « cagée ». Ce rendement quantique de photolyse devra être déterminé par actinométrie au ferrioxalate de potassium (Hatchard et Parker, 1956) et il pourrait même être meilleur que dans le cas du glutamate « cagé » : en effet, la coumarine agit comme une « antenne » pour une « photolyse assistée par le substrat » ce qui augmente le rendement quantique de photolyse en comparaison à un substrat classique (Zhao *et al.*, 2004). De plus, une sonde de type fluorényle est en cours de développement avec une équipe avec qui nous collaborons (J.F. Nicoud à Strasbourg) et qui présente des propriétés biphotoniques exceptionnelles. Une fois un fluorophore type résorufine « cagé » avec ce nouveau groupement photolabile, ce nouveau fluorophore photoactivable pourrait avoir des propriétés très intéressantes. Tous ces critères se sont révélés bons voire excellents et nous permettent de présager de résultats intéressants pour les tests cellulaires, une fois que la fixation du composé **22(Ni^{2+})** sur des protéines ayant une séquence polyhistidine aura été confirmée. Il faudra aussi confirmer la non-toxicité de la molécule sur des temps plus longs (6 h, 24 h) et vérifier que les mises au point pour les cellules HeLa sont généralisables à d'autres types cellulaires.

Une fois que nous aurons effectué tous les contrôles nécessaires pour valider notre stratégie d'étiquetage d'une protéine par un fluorophore photoactivable dans des cellules

de mammifères (HeLa) et de levure (*Saccharomyces cerevisiae*), nous pourrons alors étudier la dynamique de protéines régulant l'assemblage du cytosquelette d'actine dans les taches corticales d'actine dans des levures bourgeonnantes, comme cela était initialement prévu.

Chapitre 4.

Partie expérimentale

Chapitre 4. Partie expérimentale

Les réactifs sont obtenus auprès des compagnies Lancaster, Sigma-Aldrich, Fluka, Acros ou Janssen et ils sont utilisés tel quels.

Les solvants anhydres ont été obtenus :

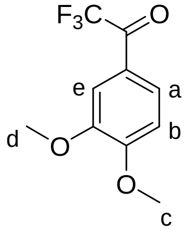
- après distillation en utilisant comme desséchant le sodium et la benzophénone pour le THF, l'hydrure de calcium pour l'éther éthylique, l'acétonitrile et le dichlorométhane.
- à partir de bouteilles commerciales neuves (Ethanol, Méthanol, DMF, DMSO, Pyridine, Dioxanne, Benzène…) rendues hermétiques et stockées sur tamis moléculaire 3 Å préalablement activé 24 heures par chauffage à 250°C sous vide poussé (≈ 10^{-3} mm Hg). Ces stocks ne sont utilisés qu'après incubation sur la zéolite pendant 24 heures.

Pour la caractérisation des produits en RMN, les déplacements chimiques, notés δ, sont en ppm. Les constantes de couplage *J* sont en Hz.

I. Synthèses

A. 1-(3,4-diméthoxyphényl)-2,2,2-trifluoro-éthanone (1)

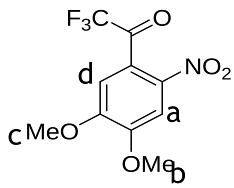
Dans un ballon anhydre, le 4-bromo-1,2-diméthoxybenzène (8,5 mL ; 59 mmol) est dilué dans 100 mL de tétrahydrofuranne (THF) anhydre. A -78°C, sous argon et agitation, le butyllithium (40,6 mL ; 64,5 mmol ; 1,1 équ.) est ajouté. Après 1 h à -78°C (formation d'un précipité blanc), le trifluoroacétate d'éthyle (7,1 mL ; 70,8 mmol ; 1,2 équ.) est ajouté. Après 1 h à -78°C, le milieu est neutralisé par une solution d'hydrogénocarbonate de sodium saturée et la phase aqueuse est extraite 3 fois par du dichlorométhane. Les phases organiques sont rassemblées, séchées par du sulfate de sodium anhydre, filtrées et évaporées à sec. Le solide est cristallisé avec de l'heptane et filtré. 10,0 g d'un solide blanc sont récupérés. ρ = 72 %



RMN ^1H ($CDCl_3$) : δ 3,96 et 4,00 (2s, 6H, Hc et Hd) ; 6,96 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H, Hb) ; 7,58 (s, 1H, He) ; 7,74 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H, Ha).

B. 1-(2-nitro-4,5-diméthoxy-phényl)-2,2,2-trifluoro-éthanone (2)

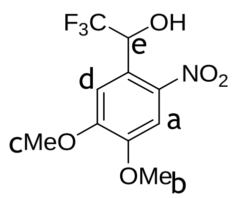
Dans un ballon anhydre, le composé **1** (2,72 g ; 11, 6 mmol) est dissous dans 14 mL d'acide sulfurique 95 %. Puis à 0°C, sous argon et agitation, on ajoute de l'acide nitrique 68 % (538 µL ; 12,2 mmol ; 1,05 équ.) dissous dans 2,6 mL d'acide sulfurique 95 %. Après 10 minutes à 0°C, le milieu est neutralisé avec de l'eau glacée puis la phase aqueuse est extraite 3 fois avec du dichlorométhane. Les phases organiques sont rassemblées, séchées par du sulfate de sodium anhydre, filtrées et évaporées à sec. Le solide est chromatographié sur colonne de silice avec heptane/ acétate d'éthyle (8/2). 1,5 g d'un solide jaune sont récupérés. ρ = 46 %



RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ 4,03 et 4,04 (2s, 6H, Hb et Hc) ; 6,85 (s, 1H, Hd) ; 7,74 (s, 1H, Ha).

C. 1-(2-nitro-4,5-diméthoxy-phényl)-2,2,2-trifluoro-éthanol (3)

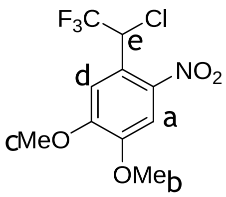
Dans un ballon anhydre, le composé **2** (2,64 g ; 9,46 mmol) est dissous dans 35 mL de dioxane anhydre. Puis à 10°C, sous argon et agitation, du borohydrure de sodium (431 mg ; 11,35 mmol ; 1,2 équ.) est ajouté. Après 2 h à température ambiante, le milieu est neutralisé avec de l'eau puis la phase aqueuse est extraite 3 fois avec de l'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec une solution de chlorure de sodium saturée, séchées par du sulfate de sodium anhydre, filtrées et évaporées à sec. 2,3 g d'un solide jaune sont récupérés. ρ = 86 %



RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ 3,97 et 4,00 (2s, 6H, Hb et Hc) ; 6,35 (m, 1H, He) ; 7,32 (s, 1H, Ha) ; 7,69 (s, 1H, Hd).

D. 1-(2-nitro-4,5-diméthoxy-phényl)-2,2,2-trifluoro-chloroéthane (4)

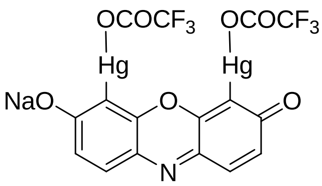
Dans un ballon anhydre, le composé **3** (365 mg ; 1,3 mmol) est dissous dans 5 mL de chlorure de thionyle anhydre. Après 16 h à 50°C, sous argon et agitation, le milieu réactionnel est évaporé à sec. Le produit obtenu est purifié sur colonne de silice (éluant : dichlorométhane). 330 mg d'un solide jaune sont récupérés. ρ = 85 %



RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ 3,97 et 4,00 (2s, 6H, Hb et Hc) ; 6,53 (m, 1H, He) ; 7,32 (s, 1H, Ha) ; 7,69 (s, 1H, Hd).

E. Résorufine-4,5-bis(mercurique trifluoroacétate) (5)

Dans un ballon anhydre, le sel de sodium de résorufine (236 mg, 1,0 mmol) est ajouté, sous argon et agitation, à une solution d'oxyde mercurique (480 mg, 2,0 mmol ; 2équ.) en suspension dans de l'acide trifluoroacétique (8 mL) à température ambiante. Après une nuit de réaction, la solution rouge sombre est devenue en partie solide. Le brut est évaporé et dilué avec de l'eau (80 mL) et le précipité est récupéré par filtration et séché sous vide. 490 mg d'une poudre rouge sombre sont récupérés. ρ = 58 %



RMN ^{1}H (DMSO-D6) : 6,95 (d, J = 9,0 Hz, 2H) ; 7,59 (d, J = 8,8 Hz, 2H).

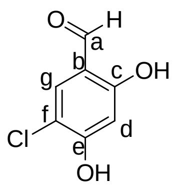
Tentative de synthèse du ReAsH-EDT_2 :

Dans un ballon anhydre, le composé **5** est dissous dans la N-Méthylmorpholine anhydre. Puis, sous argon et agitation, le chlorure d'arsenic ($AsCl_3$; 23 équ.), l'acétate de palladium ($Pd(OAc)_2$; quantité catalytique) et la DIEA (9 équ.) sont ajoutés. La réaction est agitée, dans le noir, 2 h à 60-70°C. Après refroidissement, un mélange d'acétone/ tampon phosphate pH7 0,25 M est ajouté ainsi de que l'éthanedithiol. La phase aqueuse

est extraite 3 fois avec du dichlorométhane. Les phases organiques sont rassemblées, lavées par une solution saturée en chlorure de sodium, séchées par du sulfate de sodium anhydre, filtrées et évaporées à sec. Le produit obtenu est purifié sur colonne de silice (éluant : dichlorométhane). Le produit est peu stable et le rendement de la réaction semble quasi nul.

F. 2,4-Dihydroxy-5-chloro-benzaldéhyde (6)

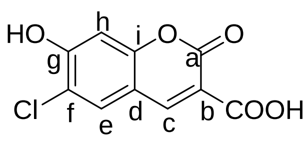
Dans un ballon, sous argon et agitation, le 2,4-dihydroxybenzaldéhyde (8,75 g ; 63 mmoles) est dissous dans 200 mL d'une solution d'acide sulfurique diluée (H_2O/H_2SO_4, 50/50, v/v) puis la N-chloropipéridine (8,3 g ; 70 mmoles ; 1,1 équ.) est ajoutée goutte à goutte. Un précipité se forme, la réaction est laissée une nuit à température ambiante. Le brut de réaction est filtré, lavée à l'eau distillée. Ensuite le produit est recristallisé avec du tétrachlorure de carbone à chaud et filtré à chaud. 8,4 g d'un solide blanc sont obtenus. ρ = 77 %



RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ 6,62 (s, 1H, Hd) ; 7,53 (s, 1H, Hg) ; 9,70 (s, 1H, Ha).
RMN ^{13}C (DMSO-D_6) : δ 103,5 (s, CH, Cd) ; 112,2 (s, C, Cb) : 116,0 (s, C, Cf) ; 130,3 (s, CH, Cg) ; 159,9 (s, C, Ce) ; 161,4 (s, C, Cc) ; 188,8 (s, CHO, Ca).

G. Acide 6-chloro-7-hydroxy-coumarine-3-carboxylique ou « coumarine » (7)

Dans un ballon anhydre, le composé **6** (8,4 g, 48,8 mmol) et l'acide malonique (10,16 g ; 97,7 mmol ; 2 équ.) sont dissous dans 44 mL de pyridine. Sous argon et agitation, 4 mL d'aniline sont ajoutés, la réaction est laissée une nuit à température ambiante. Au matin, il y a un précpité qui est dilué avec 70 mL d'éthanol pendant 1h à température ambiante. Puis la réaction est filtrée et lavée avec de l'acide chlorhydrique 0,1 M puis avec de l'eau et enfin avec de l'éther. 9,37 g d'un produit jaune sont obtenus. ρ = 80 %

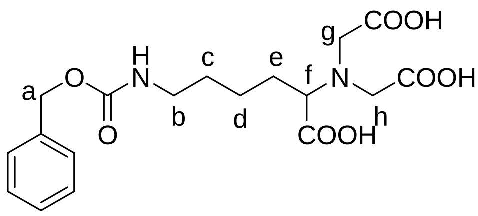


RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ 6,65 (s, 1H, Hh) ; 7,93 (s, 1H, He) ; 8,73 (s, 1H, Hc).

RMN ^{13}C (DMSO-D_6) : δ 103,7 (s, CH, Ch) ; 112,1 (s, C, Cd) : 114,9 (s, C, Cb) ; 118,5 (s, C, Cf) ; 131,6 (s, CH, Ce) ; 149,2 (s, CH, Cc) ; 156,0 (s, C, Ci) ; 157,7 (s, C, Cg) ; 159,6 (s, Ca) ; 164,9 (s, COOH).

H. *N*α,*N*α-Bis(carboxyméthyl)-Nε-(carboxybenzyl)-L-lysine (8)

Dans un ballon, l'acide bromoacétique (11,1 g ; 80,25 mmol ; 2,5 équ.) est dissous dans 63 mL d'hydroxyde de sodium (NaOH) 2 M et refroidit à 0°C. Une solution de *N*α-benzyloxycarbonyl-L-lysine (9 g ; 32,1 mmol) dans 49 mL d'hydroxyde de sodium 2 M est ajoutée goutte à goutte dans la solution d'acide bromoacétique en mélangeant dans un bain à 0°C. Après 2 h, le bain refroidissant est enlevé et la solution est mélangée sur la nuit à température ambiante. La solution est alors chauffée pendant 2 h à 50°C et 71 mL d'acide hydrochlorique (HCl) 1 M sont ajoutés goutte à goutte. Le mélange est ensuite refroidi à température ambiante pour permettre à l'acide *N*'-benzyloxycarbonyl-nitrilotriacétique (Z-NTA) de précipiter. Le Z-NTA est collecté par filtration et ensuite purifié en le dissolvant avec 1 M de NaOH et le reprécipitant avec la même quantité de HCl 1 M et en filtrant. Le cycle dissolution-reprécipitation est répété deux fois. 6,4 g d'un solide blanc sont récupérés. ρ = 50 %

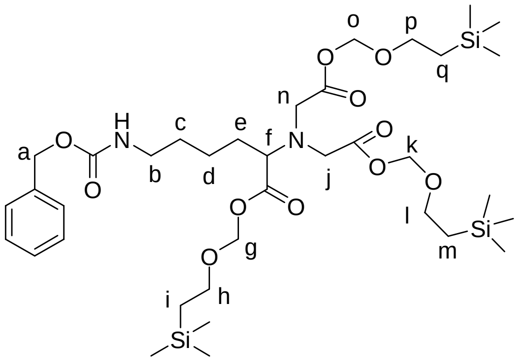


RMN ^{1}H (DMSO-D_6) : δ 1,37 (m, 4H, Hc et Hd) ; 1,58 (m, 1H, He) ; 2,96 (m, 2H, Hb) ; 3,32 (t, 1H, Hf) ; 3,46 (s, 4H, Hg et Hh) ; 5,00 (s, 2H, Ha) ; 7,34 (m, 5H, Haromatiques).

I. [Triméthylsilyl(éthoxy)]méthyl-Nα,Nα-bis{[2-triméthyl silyl(éthoxy)méthoxy]carbonyl}-(carboxybenzyl)-L-lysine (9)

Dans un ballon anhydre, le composé **6** (3,4 g ; 8,58 mmol) est dissous dans 40 mL de DMF anhydre et refroidit à 0°C. Puis, sous argon et agitation, du chlorure de triméthylsilyl-éthoxy-méthyle (6,1 mL ; 34,34 mmol ; 4 équ.) et de la DIEA (6 mL ; 34,34 mmol ; 4équ.) sont ajoutés. Après 1 h à 0°C, la réaction est laissée 1 h à température ambiante. Le brut est évaporé à sec puis redissous avec de l'hydrogénocarbonate de sodium saturée et la

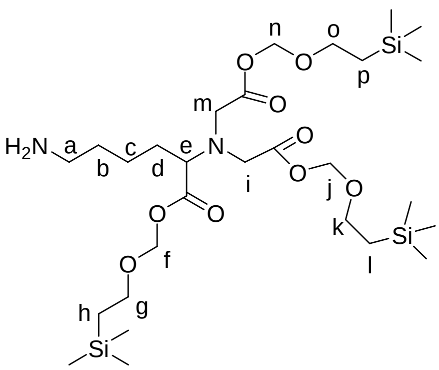
phase aqueuse est extraite 3 fois avec du dichlorométhane. Les phases organiques sont rassemblées, séchées par du sulfate de sodium anhydre, filtrées et évaporées à sec. Le produit obtenu est purifié sur colonne de silice (éluant : dichlorométhane). 5,9 g d'une huile jaune sont récupérés. ρ = 87 %



RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ 0,03 (s, 27H, -Si**(CH_3)$_3$**) ; 0,97 (t, 6H, Hi, Hm et Hq) ; 1,52-1,71 (m, 6H, Hc, Hd et He) ; 3,19 (m, 2H, Hb) ; 3,70 (m, 11H, Hf, Hh, Hj, Hl, Hn et Hp) ; 5,09 (s, 2H, Ha) ; 5,28 (m, 6H, Hg, Hk et Ho) ; 7,35 (m, 5H, Haromatiques).

J. [Triméthylsilyl(éthoxy)]méthyl-*Nα,Nα*-bis{[2-triméthylsilyl(éthoxy)méthoxy]carbonyl}-L-lysine ou « Lysine- NTA-SEM$_3$ » (<u>10</u>)

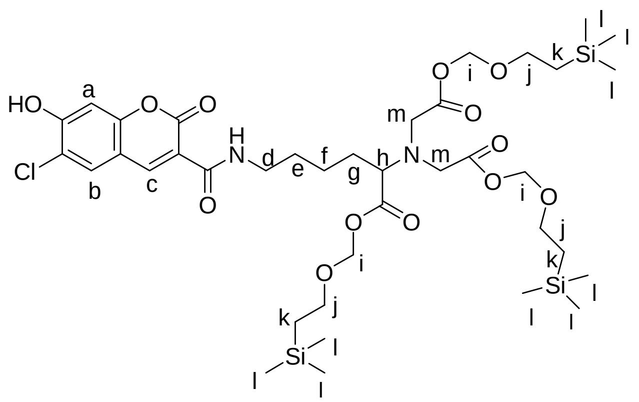
Dans un ballon anhydre, le composé <u>**7**</u> (5,9 g ; 7,50 mmol) est dissous dans 59 mL d'éthanol. Puis, sous argon et agitation, du Pd/C 10 % (590 mg) est ajouté. Le ballon est ensuite placé sous hydrogène et la réaction est laissée 24 h à température ambiante. Le brut est filtré sur célite puis le filtrat est évaporé à sec. 4,8 g d'une huile jaune sont récupérés. ρ = 98 %



RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ 0,02 (s, 27H, -Si**(CH_3)$_3$**) ; 0,96 (t, 6H, Hh, Hl et Hp) ; 1,26-1,75 (m, 6H, Hb, Hc et Hd) ; 2,67 (t, 2H, Ha) ; 3,67-3,79 (m, 11H, He, Hg, Hi, Hk, Hm et Ho) ; 5,29 (m, 6H, Hf, Hj et Hn).

K. « Coumarine-Lysine-NTA-SEM$_3$ » (**11**)

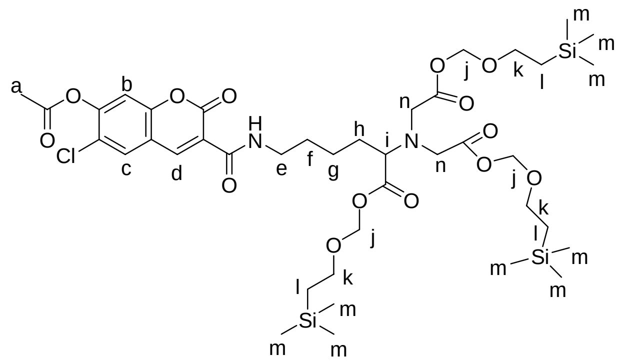
Dans un ballon anhydre, le composé **7** (3,3 g ; 13,63 mmol ; 1,8 équ.) est dissous dans 28 mL de DMF anhydre et est refroidit à 0°C. Puis, sous argon et agitation, le N-Hydroxysuccinimide (1,6 g ; 13,63 mmol ; 1,8 équ.) est ajouté et la réaction est laissée 1 h à 0°C. Puis le DCC (3,1 g ; 15,00 mmol ; 2 équ.) est ajouté et la réaction est laissée encore 30 min à 0°C puis 2 h à température ambiante. Un mélange de NTA-SEM$_3$ (4,8 g ; 7,36 mmol) et de DIEA (2,37 mL ; 13,63 mmol ; 1,8 équ.) dissous dans 18,5 mL de DMF anhydre est ajouté à la réaction qui est encore laissée 3 h à température ambiante. Le brut est évaporé à sec puis neutralisé avec de l'eau et la phase aqueuse est extraite 3 fois avec du dichlorométhane. Les phases organiques sont rassemblées, séchées par du sulfate de sodium anhydre, filtrées et évaporées à sec. Le produit obtenu est purifié sur colonne de silice (éluant : heptane/ acétate d'éthyle, 1/1). 1,3 g d'un solide jaune sont récupérés. ρ = 20 %



RMN ^{1}H (CDCl$_3$) : δ 0,02 (s, 27H, Hl) ; 0,96 (t, 6H, Hk) ; 1,26-1,75 (m, 6H, He, Hf et Hg) ; 3,45 (m, 3H, Hd et Hh) ; 3,68 (m, 10H, Hj et Hm) ; 5,29 (m, 6H, Hi) ; 7,07 (s, 1H, Ha) ; 7,65 (s, 1H, Hb); 8,75 (s, 1H, Hc).

L. « Ac-Coumarine-Lysine-NTA-SEM$_3$ » (**12**)

Dans un ballon anhydre, le composé **11** (329 mg ; 0,38 mmol) est dissous dans 3 mL de dichlorométhane anhydre. Sous argon et agitation, l'anhydride acétique (39 µL ; 0,41 mmol ; 1,1 équ.) et la pyridine (3 µL ; 38 µmol ; 0,1 équ.) sont ajoutés et la réaction est laissée une nuit à température ambiante. Le brut est évaporé à sec puis redissous dans l'eau et la phase aqueuse est extraite 3 fois avec du dichlorométhane. Les phases organiques sont rassemblées, lavées par du chlorure de sodium, séchées par du sulfate de sodium anhydre, filtrées et évaporées à sec. 278 mg d'un solide jaune sont récupérés. ρ = 80 %

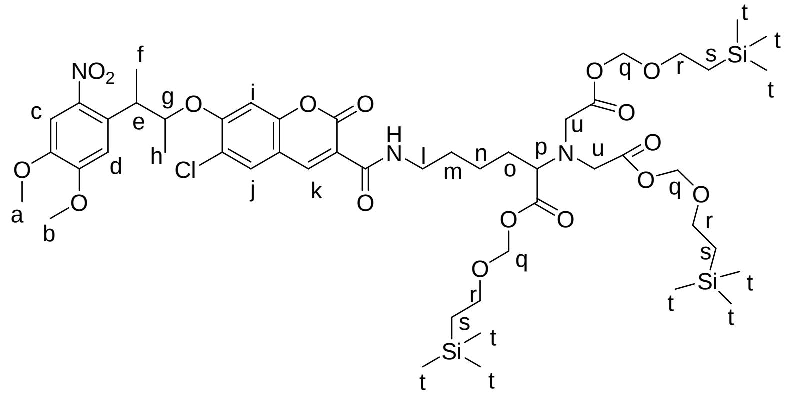


RMN [1]H ($CDCl_3$) : δ 0,02 (s, 27H, Hm) ; 0,96 (t, 6H, Hl) ; 1,67 (m, 6H, Hf, Hg et Hh) ; 2,4 (s, 3H, Ha) ; 3,45 (m, 3H, He et Hi) ; 3,68 (m, 10H, Hk et Hn) ; 5,29 (m, 6H, Hj) ; 7,25 (s, 1H, Hb) ; 7,77 (s, 1H, Hc) ; 8,72 (s, 1H, Hd).

La déprotection s'est faite par ajout de 4 équivalents de Bu_4NF en solution dans le THF, après 2 h à 0°C, la réaction est laissée une nuit à température ambiante. Le brut est évaporé à sec. Ensuite la purification par HPLC n'a pas permis d'obtenir le produit désiré. En effet, toutes les formes protonées ou déprotonée sont visibles sur le chromatogramme en plus d'autres impuretés ce qui rend difficile la purification. De plus, l'acétyle s'hydrolyse dans les conditions de purification utilisées.

M. « Cage-coumarine-Lysine-NTA-SEM$_3$ » (<u>**13**</u>)

Dans un ballon anhydre, sous argon et agitation, le composé **<u>11</u>** (910 mg ; 1,04 mmol) et le 3-(4,5-diméthoxy-2-nitrophényl)butan-2-ol (645 mg ; 2,53 mmol ; 2,4 équ.) sont dissous dans 7 mL de benzène anhydre. Dans un autre ballon anhydre, sous argon et agitation, la triphénylphosphine (1,23 g ; 4,68 mmol ; 4,5 équ.) et le DIAD (922 µL ; 4,68 ; 4,5 équ.) sont dissous dans 8 mL de benzène distillé. Ce mélange est ensuite ajouté dans le ballon contenant la coumarine-NTA-SEM$_3$ et la « cage ». La réaction est laissée une nuit à température ambiante. Le brut est évaporé à sec et chromatographié sur gel de silice (éluant : heptane/acétate d'éthyle, 7/3). 728 mg d'un solide jaune sont récupérés. ρ = 63 %

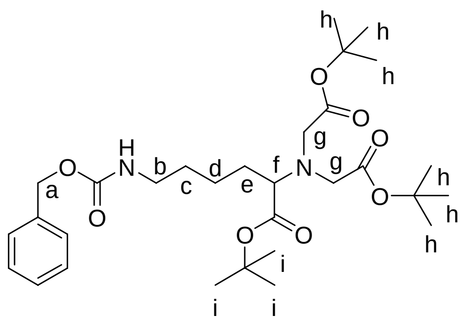


RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ 0,02 (s, 27H, Ht) ; 0,96 (t, 6H, Hs) ; 1,26-1,75 (m, 15H, Hf, Hh, Hm, Hn et Ho) ; 3,45 (m, 3H, Hl et Hp) ; 3,70 (m, 10H, Hr et Hu) ; 3,78 (q, 1H, He) ; 3,92 (s, 6H, Ha et Hb) ; 4,85 (q, 1H, Hg) ; 5,29 (m, 6H, Hq) ; 6,76 (s, 1H, Hd) ; 7,07 (s, 1H, Hi) ; 7,43 (s, 1H,Hc) ; 7,64 (s, 1H, Hj) ; 8,72 (s, 1H, Hk).

La déprotection s'est faite par ajout de 4 équivalents de Bu_4NF en solution dans le THF, après 2h à 0°C, la réaction est laissée une nuit à température ambiante. Le brut est évaporé à sec. Ensuite la purification par HPLC n'a pas permis d'obtenir le produit désiré. En effet, toutes les formes protonées ou déprotonée sont visibles sur le chromatogramme en plus d'autres impuretés ce qui rend difficile la purification.

N. (tert-Butoxy)-*Nα,Nα*-bis(2-tert-butoxycarbonylméthy)l-Nε-carboxybenzyl-L-lysine (14)

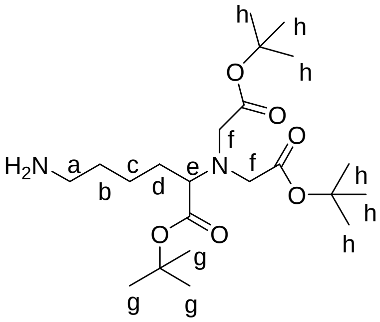
Dans un ballon anhydre, le bromoacétate de tert-butyle (8 mL ; 54 mmol ; 4 équ.) et la DIEA (1,5 mL ; 67,5 mmol ; 5 équ.) sont ajoutés séquentiellement, sous argon et agitation, à une solution de Nε-benzyloxycarbonyl-L-lysine tert-butyl ester (5 g ; 13,4 mmol) dans 100 mL de DMF anhydre. La réaction est laissée pour la nuit à 55°C. Le brut est évaporé à sec. Une solution de cyclohexane : acétate d'éthyle (3:1) est ajoutée au brut de réaction partiellement solidifié. Le mélange ainsi obtenu est filtré sur un fritté en verre et le précipité est lavé trois fois avec ce même mélange de solvants. Le filtrat est évaporé sous vide et chromatographié sur gel de silice (éluant : cyclohexane / acétate d'éthyle, 3/1). 7,5 g d'une huile incolore sont récupérés. ρ = 98%



RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ 1,44 (s, 18H, Hh) ; 1,47(s, 9H, Hi) ; 1,49-1,65 (m, 6H, Hc, Hd et He) ; 3,21 (m, 2H, Hb) ; 3,31 (t, 1H, Hf) ; 3,46 (2s, 4H, Hg) ; 5,10 (s, 2H, Ha) ; 7,3 (m, 5H, Haromatiques)

O. (tert-Butoxy)-$N\alpha,N\alpha$-bis(2-tert-butoxycarbonylméthyl)-L-lysine (15)

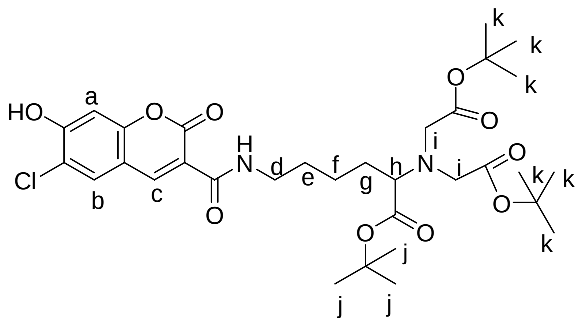
Dans un ballon anhydre, le composé **14** (7 g ; 12,4 mmol) est dissous dans 280 mL de méthanol. Puis, sous argon et agitation, le Pd/C 10 % (450 mg) est ajouté. La réaction est agitée vigoureusement sous H_2 pendant 24 h à température ambiante. Le brut est filtré sur célite puis le filtrat est évaporé à sec. 5,3 g d'une huile incolore sont récupérés. ρ = 98%



RMN ^{1}H (CDCl3) : δ 1,45 (s, 18H, Hh) ; 1,47(s, 9H, Hg) ; 1,49-1,65 (m, 6H, Hb, Hc et Hd) ; 2,69 (t, 2H, Ha) ; 3,32 (t, 1H, He) ; 3,48 (2s, 4H, Hf).

P. « Coumarine-Lysine-NTA-tBu$_3$ » (16)

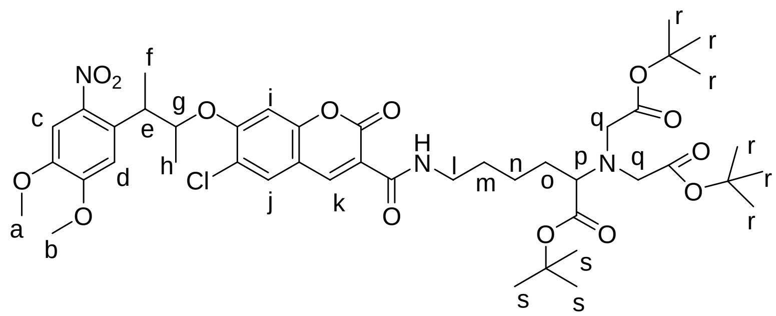
Dans un ballon anhydre, le composé **7** (2,8 g ; 11,9 mmol ; 1,6 équ.) est dissous dans 35 mL de DMF anhydre et est refroidit à 0°C. Puis, sous argon et agitation, le N-Hydroxysuccinimide (1,5 g ; 13,09 mmol ; 1,8 équ.) est ajouté et la réaction est laissée 1 h à 0°C. Puis le DCC (2,7 g ; 13,09 mmol ; 1,8 équ.) est ajouté et la réaction reste encore 30 min à 0°C puis 2 h à température ambiante. Un mélange du composé **15** (3,1 g ; 7,14 mmol) et de DIEA (2,28 mL ; 13,09 mmol ; 1,8 équ.) dissous dans 15 mL de DMF anhydre est ajouté à la réaction qui est alors laissée 3 h à température ambiante. Le brut est évaporé à sec puis redissous avec de l'eau et la phase aqueuse est extraite 3 fois avec du dichlorométhane. Les phases organiques sont rassemblées, séchées par du sulfate de sodium anhydre, filtrées et évaporées à sec. Le produit obtenu est purifié sur colonne de silice (éluant : heptane/ acétate d'éthyle, 1/1). 2,09 g d'un solide jaune sont récupérés. ρ = 45 %



RMN ^{1}H (CDCl3) : δ 1,45 (s, 18H, Hk) ; 1,46(s, 9H, Hj) ; 1,63-1,70 (m, 6H, He, Hf et Hg) ; 3,33 (t, 1H, Hh) ; 3,40 (m ; 2H, Hd) ; 3,48 (2s, 4H, Hi) ; 7,06 (s, 1H, Ha) ; 7,65 (s, 1H, Hb) ; 8,75 (s, 1H, Hc).

Q. « Cage-Coumarine-Lysine-NTA-tBu$_3$ » (17)

Dans un ballon anhydre, sous argon et agitation, le composé **16** (938 mg ; 1,44 mmol) et le 3-(4,5-diméthoxy-2-nitrophényl)butan-2-ol (733 mg ; 2,88 mmol ; 2 équ.) sont dissous dans 10 mL de benzène anhydre. Dans un autre ballon anhydre, sous argon et agitation, la triphénylphosphine (1,13 g ; 4,32 mmol ; 3 équ.) et le DIAD (850 µL ; 4,32 mmol ; 3 équ.) sont dissous dans 5 mL de benzène distillé, le mélange est ensuite ajouté goutte à goutte dans le ballon contenant la coumarine-NTA-tBu$_3$ et la « cage ». Il est rincé avec 5 mL de benzène distillé et le contenu est de nouveau ajouté au premier ballon. La réaction est laissée une nuit à température ambiante. Le brut est évaporé à sec et chromatographié sur gel de silice (éluant : heptane/acétate d'éthyle, 7/3). Puis comme le produit n'est pas pur, il est ensuite purifié par HPLC en mode isocratique (éluant : acétonitrile/ TFA à 0,1 %, 75/25) Après le mélange obtenu est ensuite extrait 3 fois avec du dichlorométhane. Les phases organiques sont rassemblées, séchées par du sulfate de sodium anhydre, filtrées et évaporées à sec. 832 mg d'un solide jaune sont récupérés. ρ = 65 %

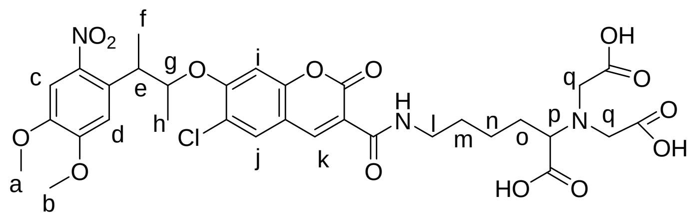


RMN ^{1}H (CDCl$_3$) : δ 1,45 (s, 18H, Hr) ; 1,46 (s, 9H, Hs) ; 1,52-1,70 (m, 12H, Hf, Hh, Hm, Hn et Ho) ; 3,33 (t, 1H, Hp) ; 3,40 (m ; 2H, Hl) ; 3,48 (2s, 4H, Hq) ; 3,78 (q, 1H, He) ; 3,89 et 3,92 (s, 6H, Ha et Hb) ; 4,84 (q, 1H, Hg) ; 6,76 (s, 1H, Hd); 7,07 (s, 1H, Hi); 7,44 (s, 1H, Hc); 7,65 (s, 1H, Hj); 8,74 (s, 1H, Hk).

API-ES-MS : 912,4 $[M+Na]^+$, 890,4 $[M+H]^+$

R. « Cage-Coumarine-Lysine-NTA » (<u>18</u>)

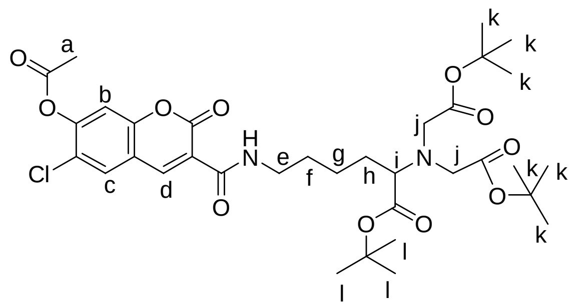
Sous argon et agitation, 65 mg du composé **<u>17</u>** (0,073 mmol) sont dissous dans 2 mL de dichlorométhane distillé, puis 2 mL de TFA sont ajoutés. La réaction est laissée 4 h à température ambiante. Le brut est évaporé à sec. Et il est précipité par de l'éther froid et lavé plusieurs fois à l'éther froid. 49,1 mg d'un solide jaune sont récupérés. ρ = 93 %



RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ 1,52-1,70 (m, 12H, Hf, Hh, Hm, Hn et Ho) ; 3,33 (t, 1H, Hp) ; 3,40 (m ; 2H, Hl) ; 3,48 (2s, 4H, Hq) ; 3,78 (q, 1H, He) ; 3,89 et 3,92 (s, 6H, Ha et Hb) ; 4,84 (q, 1H, Hg) ; 6,76 (s, 1H, Hd); 7,07 (s, 1H, Hi); 7,44 (s, 1H, Hc); 7,65 (s, 1H, Hj); 8,74 (s, 1H, Hk).
API-ESI-MS : 720.1 $[M-H]^-$

S. « Ac-Coumarine-Lysine-NTA-tBu$_3$ » (<u>19</u>)

Dans un ballon anhydre, le composé **<u>16</u>** (44 mg ; 67,36 mmol) est dissous dans 2 mL de dichlorométhane anhydre et est refroidit à 0°C. Puis, sous argon et agitation, la triéthylamine (11,3 µL ; 80,83 mmol ; 1,2 équ.) et le (5,4 µL ; 74,09 mmol ; 1,1 équ.) sont ajoutés et la réaction est laissée 110 min à 0°C puis 1 h à température ambiante. Le brut est évaporé à sec puis redissous avec de l'eau et la phase aqueuse est extraite 3 fois avec du dichlorométhane. Les phases organiques sont rassemblées, séchées par du sulfate de sodium anhydre, filtrées et évaporées à sec. Le produit obtenu est purifié sur colonne de silice (éluant : heptane/ acétate d'éthyle, 1/1). 37 mg d'un solide jaune sont récupérés. ρ = 87 %

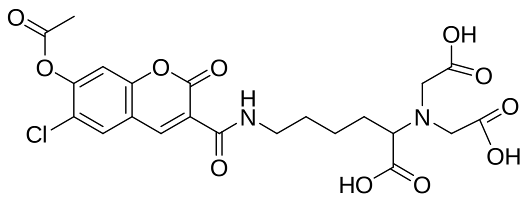


RMN ^{1}H ($CDCl_3$) : δ 1,45 (s, 18H, Hk) ; 1,46 (s, 9H, Hl) ; 1,57-1,70 (m, 6H, Hf, Hg et Hh) ; 2,42 (s, 3H, Ha) ; 3,33 (t, 1H, Hi) ; 3,42-3,56 (m ; 6H, He et Hj) ; 7,26 (s, 1H, Hb) ; 7,77 (s, 1H, Hc) ; 8,82 (s, 1H, Hd).

RMN ^{13}C (CDCl3) : δ 21,0 (s, CH_3a) ; 23,9 (s, CH_2g) ; 28,5 et 28,6 (2s, CH_3 *t*Bu) ; 29,6 (s, CH_2f) ; 30,8 (s, CH_2h) ; 40,4 (s, CH_2e) ; 54,1 (s, CH_2 j) ; 65,6 (s, CHi) ; 81,0 et 81,5 (2s, C *t*Bu) ; 112,8 (s, CHb) ; 124,8 (s, Cc-**C**-Cd) ; 127,5 (s, Cd-**C**-CO) ; 129,3 (s, CCl) ; 133,5 (s, CHc) ; 150,4 (s, CHd) ; 153,6 (s, Cb-**C**-O) ; 155,1 (s, CCl-**C**O) ;158,7 (s, O-CO-C) ; 160,9 (s, CO-NH) ; 168,0 (s, CH3-**C**O-O) ; 171,0 et 172,7 (s, COO-tBu)

T. « Ac-Coumarine-Lysine-NTA » (20)

Sous argon et agitation, 19,1 mg du composé **19** (0,027 mmol) sont dissous dans 0,5 mL de dichlorométhane distillé, puis 0,5 mL de TFA sont ajoutés. La réaction est laissée 5 h à température ambiante. Le brut est évaporé à sec. Et il est précipité par de l'éther froid et lavé plusieurs fois à l'éther froid. 14,8 mg d'un solide jaune sont récupérés. ρ = quantitatif



API-ESI-MS : 525,1 $[M-H]^-$
Le temps de rétention HPLC sur une colonne analytique C18 Acclaim (4,6J 250 mm) en utilisant un gradient linéaire de 30 min de 0 à 100 % d'acétonitrile dans une solution aqueuse avec 0,1 % de TFA à 1 mL/min puis d'un mode isocratique de 10 min à 100 % d'acétonitrile est de 32,76 min. Pureté > 97 %
Temps de demi-vie de 4 h dans du tampon phosphate pH 7,2.

II. Culture des cellules HeLa

Les cellules HeLa proviennent de la plateforme de culture cellulaire de l'IGBMC, Strasbourg. La mise en culture se fait à 37°C, 5 % CO_2 dans des boîtes de 75 cm^2 contenant 20 mL de milieu de culture DMEM contenant 1 g/L de D-glucose et L-Glutamine (Gibco BRL) supplémenté en sérum de veau fœtal (5 %), et 40 µg/L de gentamycine. A confluence, les cellules sont détachées par ajout de trypsine (5 min, T° ambiante) et sont comptées avec une cellule de numération Bürker après coloration vitale au bleu de Trypan. Elles sont ensuite ensemencées sur lamelle de verre dans les chambres de culture Lab-Tek (Nunc) à une densité de 71 000 cellules/cm^2. Ces Lab-Tek permettent d'étudier des cellules vivantes.

III. Incubation avec les différents dérivés de la coumarine

Le milieu de culture est aspiré et les cellules sont lavées avec du tampon HBSS pH 7,35 puis incubées 30 min à 37°C avec le composé dilué dans du tampon HBSS modifié. Après trois lavages avec du tampon HBSS, les cellules sont visualisées au microscope confocal à la plateforme d'imagerie de l'IGBMC. La lame est maintenue à 37°C avec une platine chauffante. Le microscope utilisé est un Leica SP2 équipé d'une diode UV permettant une excitation à 405 nm, les cellules sont observées avec un objectif X63 à immersion à huile.

HBSS : NaCl 8 g/L ; Na_2HPO_4 0,06 g/L ; KCl 0,4 g/L ; KH_2PO_4 0,06 g/L ; $NaHCO_3$ 0,35g/L ; HEPES 100 mM pH 7,35 ; Glucose 2 g/L

Partie 2.

Dynamique et recherche de nouveaux partenaires de Bzz1p, membre de la famille PCH

Chapitre 1.

Introduction

Chapitre 1. Introduction

La cellule eucaryote est capable d'adopter une variété de formes, se mouvoir, se diviser ou se différencier grâce à un réseau interne très complexe et hautement dynamique. Ce réseau est composé de longs filaments protéiques qui s'étendent dans tout le cytoplasme. Ce réseau très structuré est appelé cytosquelette, bien qu'il subisse une réorganisation continuelle en réponse à de nombreux stimuli intra- ou extra-cellulaires. Le cytosquelette est composé de trois types de fibres : les microfilaments, les microtubules et les filaments d'intermédiaires. Chaque type de filament est constitué à partir d'un monomère protéique : l'actine pour les microfilaments, la tubuline pour les microtubules et une famille de protéines fibreuses chez les mammifères telles que la vimentine ou la lamine pour les filaments intermédiaires. Bien que ces différents types de filaments soient impliqués dans des fonctions différentes, ils sont capables de coopérer dans certains processus biologiques.

I. Le cytosquelette d'actine

Toutes les cellules eucaryotes, levures, champignons ou fungi, plantes, invertébrés ou vertébrés, contiennent de l'actine. Cette protéine est très abondante : elle représente en moyenne 5 % des protéines totales de la cellule, et cette proportion peut atteindre 20 % dans les cellules musculaires. L'actine est hautement conservée au cours de l'évolution ; des comparaisons de séquences ont montré en moyenne 80 à 90 % d'identité entre les actines et ceci quelle que soit leur origine (Sheterline et Sparrow, 1994). Cette importante conservation de séquence reflète les contraintes imposées par les fonctions cellulaires essentielles de cette protéine. Certains eucaryotes inférieurs, comme les levures *Saccharomyces cerevisiae* ou *Schizosaccharomyces pombe*, ne possèdent qu'un seul gène (*ACT1*) codant pour l'actine (Act1p). Les eucaryotes supérieurs possèdent plusieurs isoformes de l'actine codées par une famille multigénique. Ainsi, chez les mammifères, il existe sept isoformes de l'actine : quatre α-actines exprimées dans différents types de cellules musculaires, une β- et deux γ-actines exprimées dans les cellules non musculaires (Sheterline et Sparrow, 1994).

A. Fonctions du cytosquelette d'actine

Dans les cellules de mammifères, le cytosquelette d'actine est requis pour la motilité cellulaire et le remodelage à la surface. Il joue un rôle dans les changements de forme cellulaire durant la mitose ; il est essentiel pour des activités contractiles telles que

la contraction des muscles ou la séparation des cellules filles par l'anneau contractile durant la cytocinèse ; il contrôle des interactions cellule-cellule et cellule-substrat grâce à des molécules d'adhésion et il participe à la signalisation transmembranaire, à l'endocytose et à la sécrétion (Bretscher, 1993; Gottlieb *et al.*, 1993; Juliano et Haskill, 1993; Luna et Hitt, 1992; Nobes et Hall, 1995; Salmon, 1989; Stossel, 1993).

Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, des mutants *act1* présentent de sérieux défauts dans la formation du bourgeon, la distribution asymétrique de l'actine pendant le cycle cellulaire, le mouvement des vésicules, la sécrétion et dans la localisation de la chitine, suggérant que la principale fonction du cytosquelette d'actine était la croissance polarisée (Dunn et Shortle, 1990; Novick et Botstein, 1985; Shortle *et al.*, 1984). D'autres études ont révélé un rôle de l'actine dans la division nucléaire et la cytocinèse (Palmer *et al.*, 1992), l'endocytose (Benedetti *et al.*, 1994; Holtzman *et al.*, 1993; Kubler et Riezman, 1993), la sélection du site de bourgeonnement (Drubin *et al.*, 1993) et le mouvement des organelles et leur positionnement (Drubin *et al.*, 1993; Lazzarino *et al.*, 1994).

Pour assurer toutes ces fonctions biologiques, l'organisation du cytosquelette d'actine doit être finement régulée temporellement et spatialement. Ces réarrangements durant le cycle cellulaire doivent être réalisés à des moments précis et les signaux intracellulaires doivent pouvoir recruter la nucléation et la polymérisation de l'actine à des sites ponctuels de la cellule. De nombreuses protéines sont associées au cytosquelette d'actine et sont ainsi des cibles pour les voies de signalisation contrôlant l'assemblage de l'actine.

B. Dynamique de la polymérisation

L'actine existe sous deux formes. Une forme monomérique appelée actine globulaire (actine G) et l'actine filamenteuse (actine F) correspondant à la forme polymérisée des monomères d'actine. La résolution de la structure tridimensionnelle de l'actine globulaire (complexée avec la DNaseI), polypeptide de 375 acides aminés, a permis de mettre en évidence que cette protéine est repliée en deux domaines globulaires flexibles (I et II) (Kabsch *et al.*, 1990). La cavité centrale entre ces deux domaines renferme le site de liaison et d'hydrolyse de l'ATP ainsi qu'un site de liaison à un cation divalent. Les ions Mg^{2+} ou Ca^{2+} liés à ce site interagissent avec les phosphates β et γ de l'ATP. La stabilité du complexe actine G – ATP - ion est assurée par la formation de liaisons hydrogènes et de ponts salins entre certains résidus et les phosphates de l'ATP ou l'ion divalent (Kabsch et Holmes, 1995).

Dans les conditions physiologiques, l'actine G pure est capable de polymériser, formant ainsi des filaments appelés microfilaments ou actine F. Un microfilament

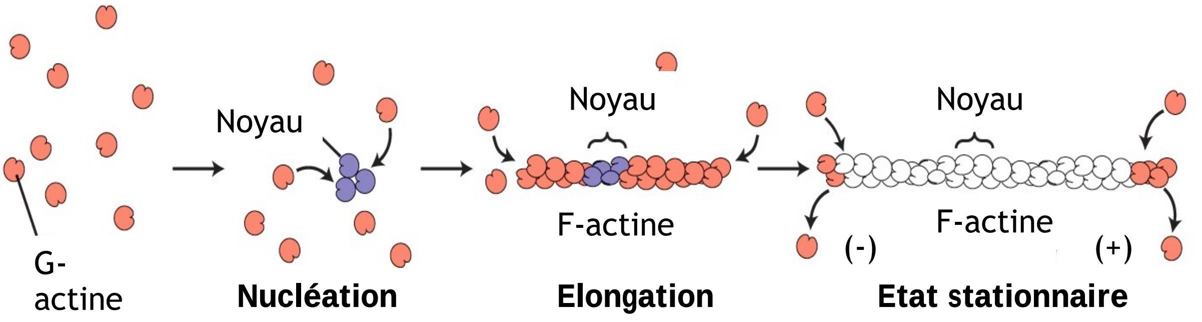


Figure 15. Processus de polymérisation de l'actine. Au cours de la nucléation, il y a assemblage d'un noyau de trois monomères d'actine qui formeront la structure de départ nécessaire à l'élongation d'un nouveau filament. L'état stationnaire correspond à l'équilibre dynamique du filament.
Adaptée de Molecular Cell Biology, Lodish (5ème édition).

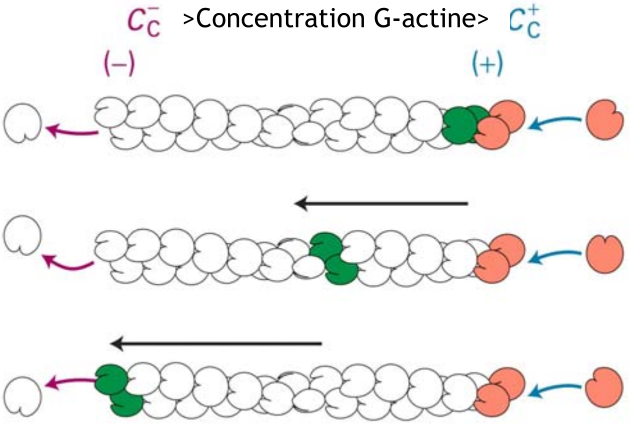


Figure 16. Dynamique du filament d'actine. Un filament d'actine de longueur constante ne signifie pas qu'il soit figé. Les monomères ajoutés au niveau de l'extrémité (+) sont renouvelés selon le principe du « tapis roulant ».
Adaptée de Molecular Cell Biology, Lodish (5ème édition).

correspond à l'assemblage en tête à queue de monomères d'actine autour d'un axe central formant une double hélice polaire d'environ 7 - 8 nm de diamètre et 37 nm de périodicité (Holmes *et al.*, 1990; Lorenz *et al.*, 1993).

Le processus de polymérisation de l'actine se déroule en trois étapes (Carlier, 1991) présentées dans la figure 15 :

- la fixation d'ions divalents induit un changement de conformation de l'actine G ; cela permet d'activer les complexes actine G – ATP - ion, les rendant compétents pour interagir entre eux.
- la nucléation est l'étape permettant à trois monomères d'actine activés de s'assembler. Ce trimère ou noyau de polymérisation, est la structure minimale nécessaire à l'élongation d'un filament.
- l'élongation correspond à l'ajout de monomères d'actine sur les noyaux de polymérisation.

Le filament d'actine est en équilibre permanent entre la polymérisation et la dépolymérisation, et ces deux événements ne se produisent pas de façon égale à chaque extrémité du filament : l'assemblage des monomères prédomine à l'extrémité barbelée (+), alors que leur dissociation prédomine à l'extrémité pointue (-). L'élongation peut être régulée par deux facteurs : la concentration critique en actine G et l'hydrolyse de l'ATP.

Ainsi, l'élongation se poursuit à chaque extrémité jusqu'à ce que la concentration en actine G atteigne une concentration critique en dessous de laquelle l'incorporation aux filaments est impossible, et la concentration critique est différente pour chaque extrémité (Wegner et Isenberg, 1983). La concentration critique inhibant l'élongation à l'extrémité (+) étant plus basse que celle de l'extrémité (-), l'extrémité (+) favorise donc l'incorporation de monomères.

Des études *in vitro* ont montré que le monomère d'actine hydrolyse son ATP dès son incorporation dans le filament (pour revue : Carlier *et al.*, 2003) et libère un phosphate inorganique (Pi) dans le milieu cellulaire. Le long du filament, chaque monomère passe par trois états différents : l'actine-ATP, fixée à l'extrémité (+), l'actine-ADP-Pi (forme transitoire) et l'actine-ADP qui s'accumule à l'extrémité (-) avant d'être dissociée du filament. A l'équilibre, la dissociation à l'extrémité (-) est compensée par l'ajout de monomères à l'extrémité (+). Grâce à cet équilibre dynamique (ou pseudo état stationnaire), la longueur du filament d'actine ne varie pas, alors que l'actine se déplace d'une extrémité à l'autre : c'est le processus de « tapis-roulant » (ou treadmilling), schématisé dans la figure 16.

C. Nucléation de la polymérisation de l'actine

Trois grands systèmes de nucléation sont connus : le complexe Arp2/3 (pour revue : Goley et Welch, 2006) et les formines (pour revue : Faix et Grosse, 2006) qui sont relativement bien conservés chez les eucaryotes. Récemment les protéines Spir ont été découvertes chez la drosophile et sont aussi capables de nucléer la polymérisation de l'actine (Quinlan *et al.*, 2005). Je n'aborde dans cette section que la nucléation par le complexe Arp2/3, la nucléation par les formines chez la levure est abordée dans la section II.B.3)b.

1) Le complexe Arp2/3

En réponse à un signal interne ou externe, la polymérisation s'initie en recrutant le complexe protéique appelé Arp2/3 (actin-related protein 2/3) qui est très bien conservé chez les cellules eucaryotes, végétales et animales. Ce complexe est composé de sept sous-unités, dont Arp2, Arp3 et cinq autres protéines dont les noms varient en fonction de l'espèce (Welch *et al.*, 1997; Winter *et al.*, 1997). Les protéines Arp2 et Arp3 ont une structure proche de celle d'un monomère d'actine et présentent 40 - 50 % et 30 - 40 % d'identité de séquence avec l'actine, respectivement (Mullins *et al.*, 1997; Poch et Winsor, 1997). Le tableau 5 donne la nomenclature ayant été élaborée pour ce complexe nommant les 7 protéines Arp2, Arp3 et ARPC1 à 5 (Arp2/3 Complex component) (Higgs et Pollard, 2001).

Nom Standard	Humain	Amibe	*S.cerevisiae*
Arp3	Arp3, Arp3β*	Arp3	Arp3p
Arp2	Arp2	Arp2	Arp2p
ARPC1A,B	p41-Arc, Sop2h*	p40	Arc40p
ARPC2	p34-Arc	p35	Arc35p
ARPC3	p21-Arc	p18	Arc18p
ARPC4	p20-Arc	p19	Arc19p
ARPC5	p16-Arc	p14	Arc15p

Tableau 5. Nomenclature des protéines du complexe Arp2/3. Le tableau indique le nom standardisé de chaque sous-unité du complexe suivi de l'ancien nom correspondant chez l'humain, *Acanthamoeba castellanii* et la levure de boulanger. * représente des isoformes de ces sous-unités. Adapté de (Higgs et Pollard, 2001).

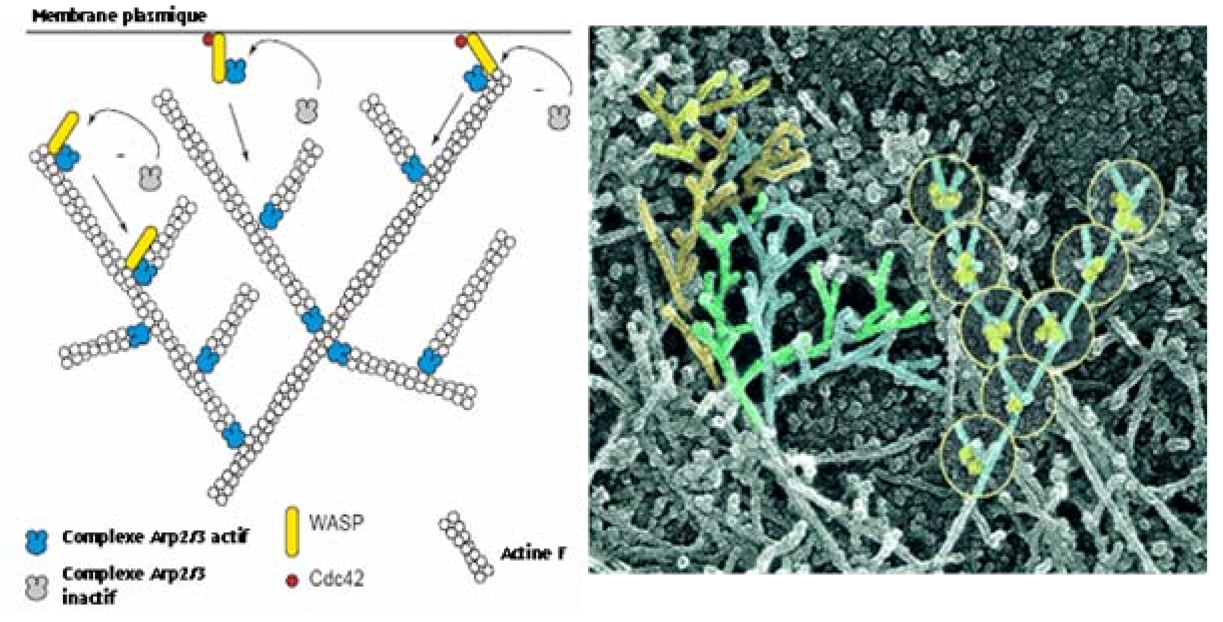


Figure 17. Arp2/3 et le réseau d'actine.
A gauche, mode de fonctionnement du complexe Arp2/3 dans la nucléation des monomères d'actine. N-WASP doit être recrutée par la forme active de Cdc42, une GTPase, pour pouvoir interagir avec Arp2/3 et stimuler l'assemblage des monomères d'actine.
Adaptée de Welch, 1999.
A droite, Réseau d'actine observé au microscope électronique. Cytosquelette d'actine dans un lamellipode d'un fibroblaste de souris. Les filaments d'actine sont colorés afin d'observer des branchements indépendants. Les inserts circulaires montrent quelques exemples de marquage « immunogold » de la sous-unité ARPC3 du complexe Arp2/3. Cette figure provenant du travail de Svitkina et Borisy, 1999 est l'image de couverture de l'édition du 31 mai 1999 du « Journal of Cell Biology » V145 n°5.

Les protéines Arp2 et Arp3 placées côte-à-côte, miment l'extrémité (+) d'un dimère d'actine. Un monomère d'actine pourrait alors venir s'associer à cette pseudo-extrémité (+) dans le complexe Arp2/3. Ce complexe trimoléculaire Arp2-Arp3-actine serait équivalent à un trimère d'actine et servirait de noyau à l'élongation de la polymérisation de l'actine. Ce processus permettrait d'outrepasser l'étape cinétiquement non favorable de dimérisation de l'actine (pour revues : May, 2001; Winder, 2003). Le complexe resterait donc attaché à l'extrémité (-), qui devient coiffée, et l'extrémité (+) peut croître. Lorsqu'il est activé, le complexe Arp2/3 permet l'assemblage de l'actine à l'extrémité (+) du filament.

Les études menées chez *Saccharomyces cerevisiae* ont montré que Arp2/3 était nécessaire à la mobilité et à l'intégrité des taches corticales d'actine (Winter *et al.*, 1997) ainsi qu'à l'endocytose (Moreau *et al.*, 1996), et qu'il est aussi capable d'interagir avec Las17p, l'homologue de WASP chez la levure (cf section I.C.2) (Madania *et al.*, 1999). L'importance de ce complexe a aussi été mise en évidence par Welch *et al.* (1997) qui ont montré qu'il était suffisant pour former la queue d'actine et générer la motilité du pathogène *Listeria monocytogenes*. La présence du complexe Arp2/3 dans son intégralité semble être cruciale pour la survie cellulaire et son organisation. En effet, des expériences de délétion de gènes ont montré une létalité dans la quasi-totalité des espèces sur lesquelles les expériences ont été faites, tant chez les levures *S. cerevisiae* (Moreau *et al.*, 1996), *S. pombe* (Balasubramanian *et al.*, 1996), l'amibe *D. discoideum* (Insall *et al.*, 2001) que dans les cellules humaines (Harborth *et al.*, 2001).

Le complexe Arp2/3 a une préférence pour le côté des filaments d'actine *in vitro* et est capable d'y initier la polymérisation d'un nouveau filament (Mullins *et al.*, 1997). Ceci conduit à la formation d'un réseau de filaments d'actine branchés en « Y » à un angle de 70° (Mullins *et al.*, 1998) (Figure 17 gauche). Cette fonction explique l'observation en microscopie électronique du réseau d'actine présentant une organisation sous forme de branches aussi nommées « réseau dendritique » (Figure 17 droite).

L'activité du complexe Arp2/3 est régulée par plusieurs facteurs. Par exemple, les protéines de coiffe sont en compétition avec Arp2/3 et réduisent donc sa capacité à promouvoir la nucléation de l'actine (Falet *et al.*, 2002). L'hydrolyse de l'ATP par Arp2/3 est essentielle à l'activité de nucléation du complexe (Dayel *et al.*, 2001). Toutefois, certaines études récentes chez la levure tendraient à montrer que l'ATP serait responsable du détachement des filaments (Kovar, 2006). D'autres activateurs de Arp2/3 sont connus, comme ActA, une protéine bactérienne utilisée par *Listeria monocytogenes* pour l'infection de la cellule humaine, la myosine I, dont on retrouve différents homologues chez les champignons et les levures ou encore la cortactine, qui a la capacité de stabiliser

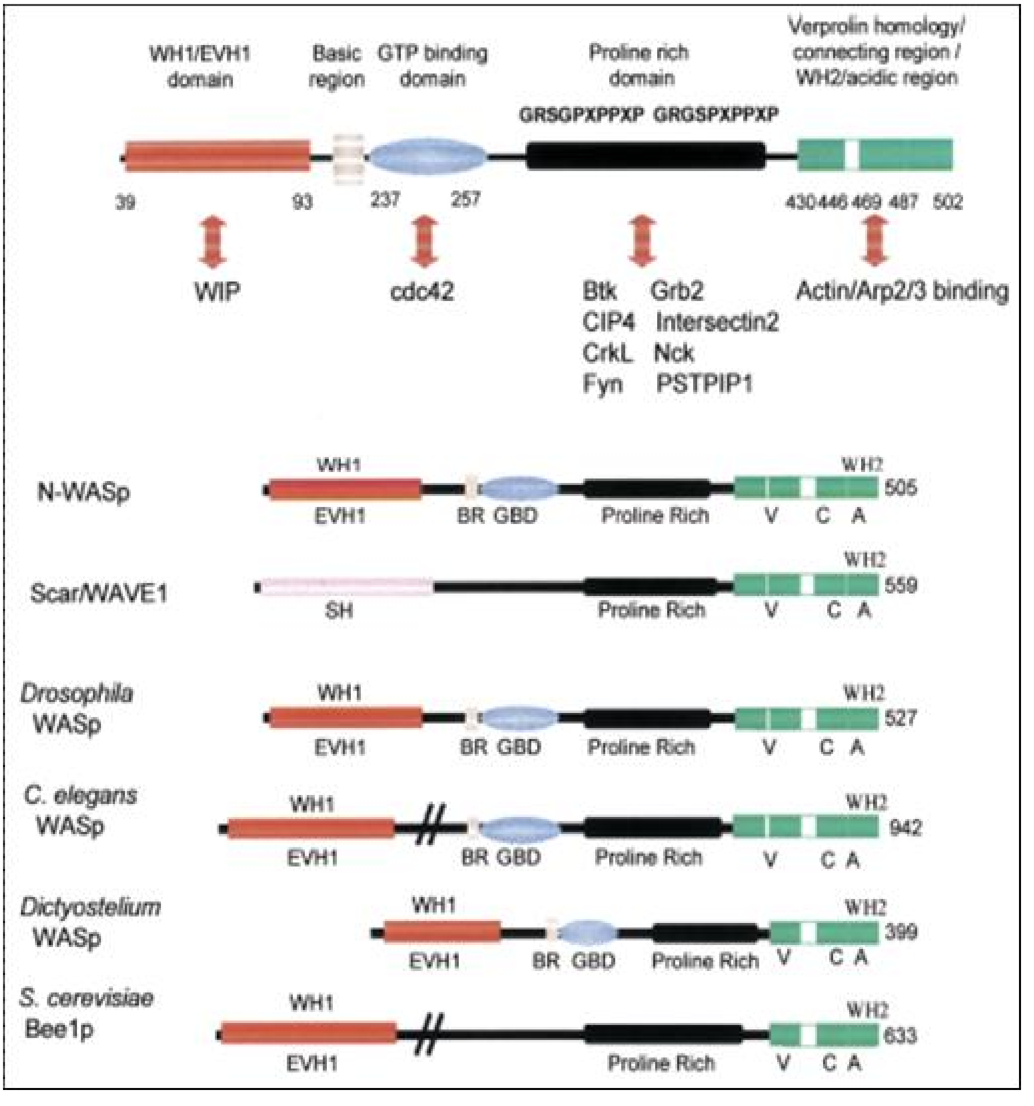


Figure 18. Les protéines de la famille WASP. L'ensemble des protéines de cette famille est organisé selon une structure modulaire similaire. WH1 & 2 = domaine « WASP Homology 1 & 2 ». PRO = région riche en résidus proline. GBD = domaine de liaison aux GTPases (GTPases Binding Domain). BR = Région basique. C = région de liaison. A = domaine acide riche en acides aspartique et glutamique.
Adaptée de Badour *et al*, 2003.

les filaments néosynthétisés par Arp2/3 (Millard *et al.*, 2004; Weaver *et al.*, 2001). Des activateurs importants et les mieux connus sont les protéines de la famille WASP, détaillée dans la section suivante.

2) *Les protéines de la famille WASP/Scar*

WASP (pour Wiskott-Aldrich Syndrome Protein), le premier membre de cette famille de protéines, a été identifié comme la protéine résultant de l'expression d'un gène muté chez les patients atteints du syndrome de Wiskott-Aldrich (Derry *et al.*, 1994), une maladie génétique liée au chromosome X. Les patients souffrant de ce syndrome présentent des problèmes immunitaires et de coagulation dus à un défaut du cytosquelette d'actine dans les globules blancs et les plaquettes (Imai *et al.*, 2003). La protéine WASP est exclusivement exprimée dans les cellules hématopoïétiques, or les organismes eucaryotes contiennent au moins une protéine présentant d'importantes similarités de séquence avec WASP ; elles ont été classées dans une famille de protéines appelées WASP/Scar. Cette famille contient l'isoforme N-WASP (Neural WASP) exprimé plus ubiquitairement que WASP (Miki *et al.*, 1996), les isoformes de Scar/WAVE (WASP Verprolin homologous protein) identifiés chez *Dictyostelium discoideum* et chez l'homme (Suetsugu *et al.*, 1999) et les protéines Wsp1 et Las17p de *Schizosaccharomyces pombe* et *Saccharomyces cerevisiae* respectivement (Lee *et al.*, 2000; Li, 1997). Ces protéines appartiennent aux nombreuses cascades de signalisation responsables de la formation de filopodes, lamellipodes et autres structures d'actine impliquées dans la mobilité cellulaire.

a) Structure

Toutes les protéines de cette famille présentent une organisation très similaire, avec une région C-terminale conservée et une région N-terminale plus variable qui régule l'activité de la partie C-terminale (Figure 18).

En effet, c'est en C-terminal que se trouvent les domaines capables de lier les monomères d'actine et de les mettre en contact avec le complexe Arp2/3, afin de promouvoir la nucléation de l'actine. Ces domaines constituent le module VCA composé d'un domaine V (aussi appelé WH2 pour WASP Homology 2) qui lie l'actine G, du domaine C (cofiline homology domain) et enfin d'une région C-terminale A sur laquelle se fixe le complexe Arp2/3. Les domaines C et V agissent en synergie afin de permettre les changements conformationnels d'Arp2/3 nécessaires à la nucléation (Panchal *et al.*, 2003b).

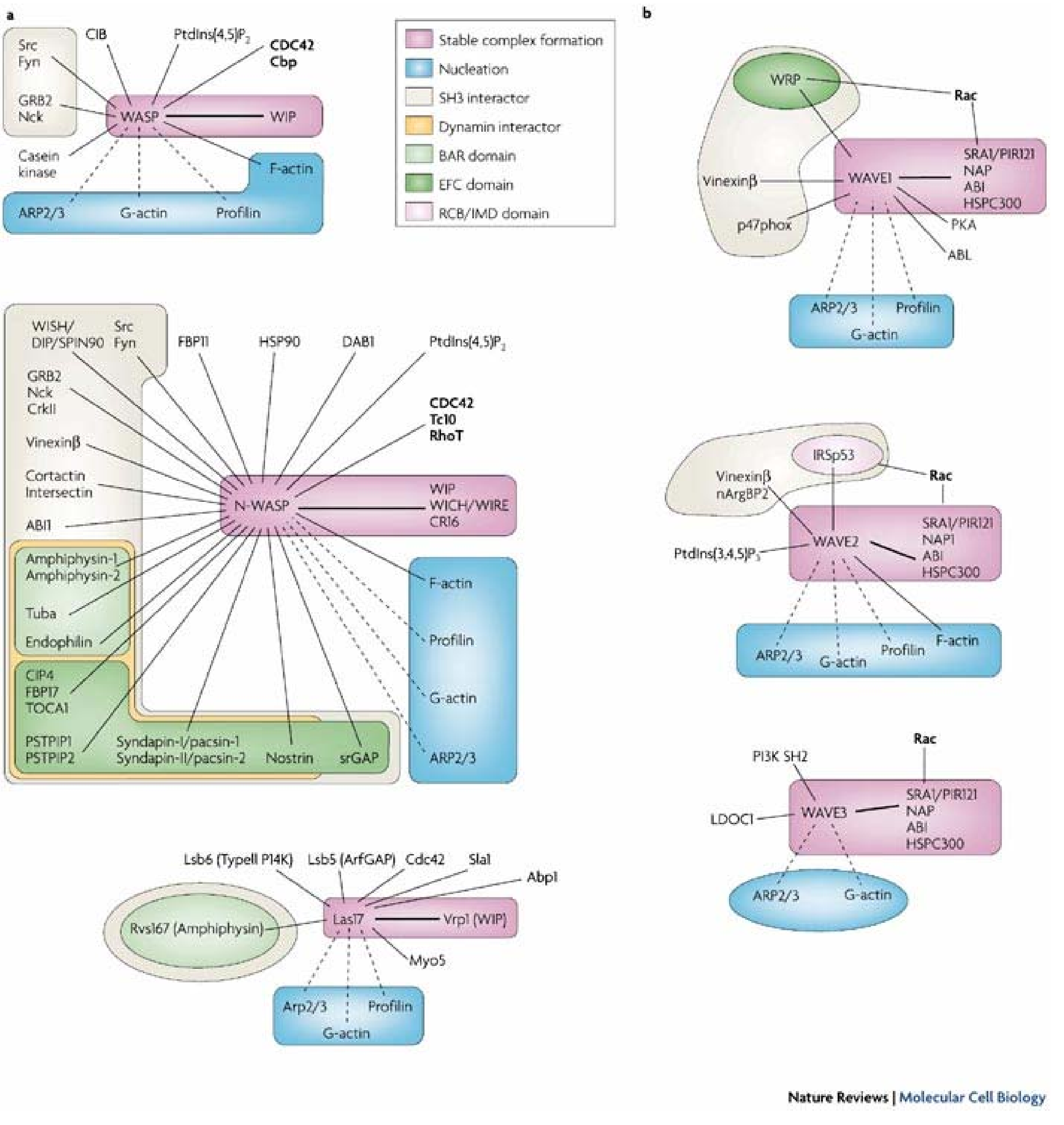


Figure 19. Partenaires de WASP et WAVE. a) WASP, N-WASP et Las17p b) WAVE 1, WAVE 2 et WAVE 3. Zones mauves : protéines formant des complexes stables avec les a)protéines de la famille WASP et les protéines de la famille WIP, b)protéines de la famille WAVE et les protéines Abelson-interacting protein (ABI), NAP1, SRA1/PIR121 et HSPC300. Zones bleues : protéines impliquées dans la nucléation de la polymérisation de l'actine. Zones beiges : protéines interagissant via leur domaine SH3. Zones vert sombre et vert clair: protéines contenant des domaines EFC et BAR, respectivement. Zones jaunes : protéines interagissant avec la dynamine. Cercle rose claire : protéines avec un domaine RCB (Rac-binding) (aussi connu comme IRSp53-Mim-homology (IMD)). En gras : petites GTPases.
CIB, calcium- and integrin-binding protein; CR16, corticosteroid and regional expression-16; FBP, formin-binding protein; GRB2, growth-factor receptor-bound protein-2; PI3K, phosphatidylinositol-3 kinase; PSTPIP, proline, serine, threonine phosphatase-interacting protein; PKA, protein kinase A; PtdIns, phosphatidylinositol; srGAP, slit-roboGAP; WICH, WIP- and CR16-homologous protein (also known as WIP-related (WIRE)) ; WRP, WAVE-associated RacGAP protein.
Adaptée de Takenawa et Suetsugu, 2007.

Un autre motif conservé présent dans chaque protéine de la famille WASP est une région riche en proline dans la partie centrale des protéines (Figure 18). Cette région est capable d'interagir avec les domaines SH3 (Src Homology) de toute une série de protéines ainsi qu'avec la profiline (pour revue : Higgs et Pollard, 2001; Takenawa et Miki, 2001; Tong *et al.*, 2002). Ces interactions constituent un des mécanismes de régulation de l'activité des protéines de la famille WASP/Scar.

Les régions N-terminales des protéines de cette famille sont assez divergentes (Figure 18). Ainsi WASP et N-WASP sont les seules représentantes de la famille à contenir un domaine de liaison aux GTPases (GBD) qui leur permet d'interagir directement avec la GTPase de type Rho, Cdc42 (Kolluri *et al.*, 1996; Miki *et al.*, 1998). Cette interaction permet la régulation de WASP et N-WASP. Le domaine WH1 (WASP Homology 1), présent dans WASP, N-WASP, Las17p et Wsp1, est fonctionnellement important car c'est à ce niveau que se trouvent beaucoup de mutations responsables du syndrome de Wiskott-Aldrich (Imai *et al.*, 2003). Le domaine BR (basic region) des protéines WASP, N-WASP, Las17p et Scar/WAVE est capable de lier le phosphatidylinositol-4,5-biphosphate ($PI(4,5)P_2$) (Higgs et Pollard, 2000; Rohatgi *et al.*, 2000). La fonction du domaine « Scar Homology » des protéines Scar/WAVE est encore inconnue à ce jour.

b) Régulation

Les membres de la famille WASP peuvent être régulés par un des deux mécanismes de base : l'auto-inhibition, dans laquelle les extrémités C- et N-terminales s'associent directement pour inhiber son activité de NPF (Nucleation promoting factor), ou la transinhibition, médiée par des interactions directes de protéines additionnelles (Bompard et Caron, 2004). Dans les deux mécanismes, l'inhibition est levée par des signaux provenant des GTPases Rho activées. Par exemple, Cdc42 se lie directement au GBD de N-WASP pour lever l'auto-inhibition (Rohatgi *et al.*, 2000) et Rac se lie directement à un des composants du complexe transinhibiteur de WAVE1 pour libérer WAVE1 active (Eden *et al.*, 2002) bien que ce mécanisme reste controversé (pour revue : (Stradal et Scita, 2006)). Cette famille de protéines est régulée par de nombreux partenaires cellulaires qui sont résumés dans la figure 19.

WIP (Wiskott-Aldrich Interacting Protein) ou Vrp1p chez la levure peut lier de façon stable WASP et N-WASP ou Las17p chez *S. cerevisiae*, grâce à leur domaine WH1, ce qui a pour effet de les inhiber. Ce complexe WASP-WIP est dissocié par Cdc42 spécifiquement en présence de Toca-1, dont l'homologue chez *S. cerevisiae* est Bzz1p, qui lie Cdc42 et N-WASP (Ho *et al.*, 2004).

L'activation de N-WASP peut également être régulée par la phosphorylation. En effet, il a été montré *in vitro* que la tyrosine 291, située près du domaine GBD, est un substrat pour les kinases des familles Abl, Btk et Src. Cette modification a pour effet d'augmenter l'activité basale de WASP (Cory *et al.*, 2003; Torres et Rosen, 2003). Toutefois, cette phosphorylation ne peut avoir lieu que si Cdc42 est liée au domaine GBD et qu'elle active WASP (Guinamard *et al.*, 1998; Torres et Rosen, 2003). Les auteurs proposent un modèle où WASP serait activée par Cdc42, permettant ainsi la phosphorylation de la tyrosine 291. Une fois WASP activée, Cdc42 s'en détache mais la phosphorylation persiste, permettant ainsi à WASP de conserver son activité même en absence de stimulus. Ce cas d'activation par phosphorylation sur une tyrosine équivalente à été démontré chez N-WASP. Il semblerait que les tyrosines-kinases de la famille Src soient impliquées *in vivo*, et que cette phosphorylation aurait pour rôle dans un premier temps d'activer N-WASP puis d'en initier la dégradation par le protéasome (Suetsugu *et al.*, 2002). WASP est aussi activé par le $PI(4,5)P_2$ (Higgs et Pollard, 2000). L'activité des protéines WASP et N-WASP peut aussi être régulée via une interaction avec des protéines possédant des domaines SH3 (Src Homology 3) (Takenawa et Miki, 2001). Généralement, la liaison de ces protéines agit en synergie avec un autre activateur ; c'est le cas par exemple de Grb2 qui, en se liant à N-WASP, augmente l'activité de nucléation d'Arp2/3 et potentialise l'effet activateur de Cdc42 (Carlier *et al.*, 2000). D'autres protéines à domaines SH3 sont connues pour interagir avec WASP telles que WISH (Fukuoka *et al.*, 2001), l'intersectine (Hussain *et al.*, 2001), la syndapine (Qualmann *et al.*, 1999) faisant ainsi de N-WASP une protéine potentiellement impliquée dans de nombreux processus.

Les protéines de la famille WAVE interagissent avec les protéines Abelson-interacting protein (ABI), NAP1, SRA1/PIR121 et HSPC300 pour former des complexes stables (Eden *et al.*, 2002; Gautreau *et al.*, 2004; Innocenti *et al.*, 2004; Stovold *et al.*, 2005; Suetsugu *et al.*, 2006) (Figure 19). La localisation de WAVE2 nécessite une liaison au $PI(3,4,5)P_3$ (Oikawa *et al.*, 2004), alors que WASP lie le $PI(4,5)P_2$ (Higgs et Pollard, 2000). WAVE2 est cruciale pour la formation des lamellipodes et WAVE1 régule la formation de « vagues » dorsales (dorsal ruffle) : des filaments d'actine assemblés de façon circulaire à la surface dorsale des cellules (Suetsugu *et al.*, 2003).

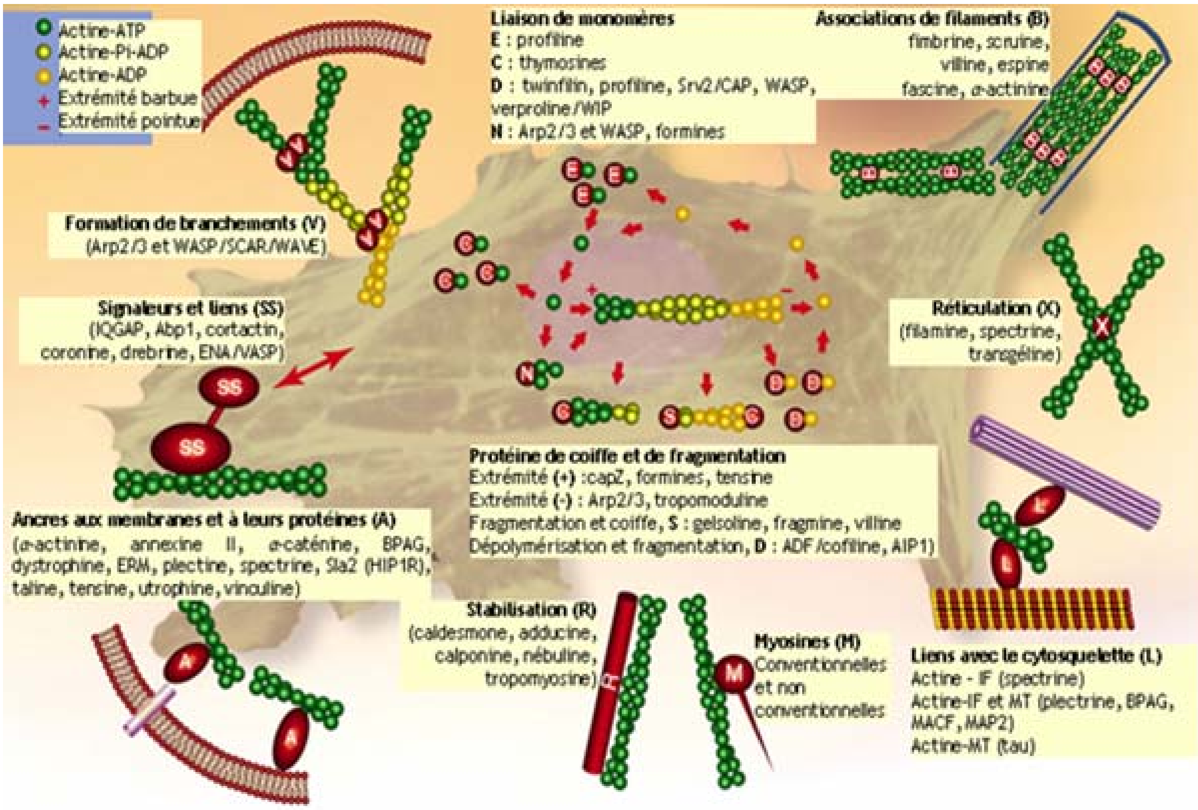


Figure 20. Ensemble des protéines interagissant avec l'actine.
Adaptée de Winder et Ayscough, 2005.

D. Régulation de la polymérisation de l'actine chez les mammifères

L'instabilité des filaments permet de réguler et d'adapter leur quantité en fonction des besoins cellulaires. En effet, ces filaments se présentent sous différentes formes selon leur fonction : filaments courts, faisceau de filaments parallèles ou réseau dense de filaments interconnectés. Cette diversité dans l'organisation de l'actine suppose une grande variété dans les molécules régulant sa dynamique (pour revue : Winder et Ayscough, 2005).

Certaines protéines lient les monomères d'actine, ces protéines travaillent de concert afin de contrôler le pool d'actine non polymérisée dans les cellules ainsi que le nucléotide lié à l'actine. Les thymosines β lient les monomères d'actine-ATP et inhibent la polymérisation de l'actine et l'échange de nucléotides. Les membres de la famille ADF/cofiline lient les monomères d'actine-ADP et inhibent l'échange de nucléotides. Les profilines lient préférentiellement les monomères d'actine dépourvus de nucléotides et elles accélèrent l'échange de nucléotides.

Les protéines de coiffe des filaments d'actine se lient à l'une ou l'autre des extrémités où elles bloquent l'adjonction ou la dissociation des sous-unités et donc régulent la croissance du filament d'actine. A l'extrémité (+), on retrouve par exemple, la gelsoline, qui piège le Ca^{2+} et bloque la dissociation et l'association des sous-unités d'actine ; la fragmine et la séverine. Le complexe Arp2/3 et la tropomoduline en association avec la tropomyosine coiffent l'extrémité (-).

Les protéines de fragmentation des filaments d'actine coupent les filaments d'actine en courts fragments comme la gelsoline, la fragmine/séverine et l'ADF/cofiline.

Par leurs deux sites de liaison à l'actine, les protéines de réticulation permettent d'associer des filaments entre eux afin de former des réseaux ou de les ancrer aux membranes. Elles sont classées en trois classes en fonction de leur structure :

- Fimbrine/plastine
- α-actinine, spectrine/fodrine, dystrophine
- ABP-120, filamine.

Il y a aussi des protéines de stabilisation des filaments d'actine comme la tropomyosine, la nébuline et la caldesmone.

La figure 20 illustre de manière non exhaustive la diversité des protéines capables de réguler la dynamique de l'actine.

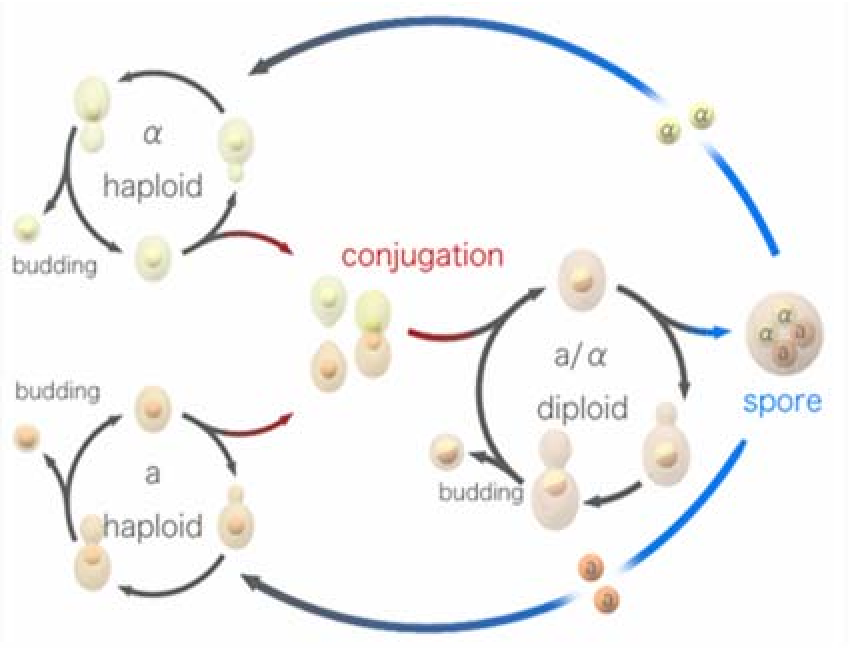


Figure 21. Le cycle de vie de la levure *Saccharomyces cerevisiae.*
http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Budding_yeast_Lifecycle.png#filehistory

II. Le cytosquelette d'actine chez *Saccharomyces cerevisiae*

La levure *S. cerevisiae* est un champignon unicellulaire capable de fermenter des matières organiques animales ou végétales. Les levures sont employées pour la fabrication du vin, de la bière, des spiritueux, des alcools industriels, du pain et d'antibiotiques. La levure *Saccharomyces cerevisiae* est aussi très utilisée comme organisme modèle en biologie cellulaire et en génétique. En 1996, ce fut le premier eucaryote dont le génome ait été séquencé. Son génome de 16 chromosomes est composé de 13 millions de paires de bases et de 4462 gènes. On estime qu'elle partage 23 % de son génome avec l'Homme (Botstein *et al.*, 1997). Chez ce microorganisme, le cytosquelette est formé de microtubules, de microfilaments et des septines. La levure possède un seul gène codant pour l'actine, *ACT1* (Shortle *et al.*, 1982), et la délétion de ce gène est létale. Elle possède aussi une dizaine de protéines apparentées à l'actine, les ARPs (Actin-related protein)(Poch et Winsor, 1997).

A. Le cycle de vie de la levure

Dans les conditions normales de croissance, la multiplication végétative des cellules de *Saccharomyces cerevisiae* se fait par bourgeonnement. Le bourgeonnement correspond à une polarisation de la croissance cellulaire et à un partage des organites entre les deux compartiments cellulaires. Cette polarisation est liée à une réorganisation du cytosquelette d'actine. La mise en place du bourgeon est sous la dépendance d'une petite protéine G de la famille Rho : Cdc42p. Celle ci fluctue entre deux formes : une liée au GDP (inactive) et une liée au GTP (active). Cdc42p est activée par Cdc24p, une protéine GEF (Guanosine Exchange Factor) et inactivée par des GAPs (GTPase Activating Protein) : Rga1p, Bem3p et Bem2p (pour revue : Pruyne et Bretscher, 2000b). Le bourgeon se développe d'abord apicalement, dans une seule direction, puis de manière isotropique, c'est-à-dire dans toutes les directions. Lorsque le bourgeon atteint une taille critique, il y a cytocinèse et détachement du bourgeon, donnant naissance à une nouvelle cellule (Figure 21).

La levure est un organisme unicellulaire que l'on trouve à l'état naturel sous forme haploïde (n chromosomes) ou diploïde (2n chromosomes) ou polyploïde. Cependant, lorsque les conditions environnementales sont défavorables à la croissance (carence en nutriments), les cellules diploïdes entrent en méiose et forment un asque contenant quatre spores haploïdes (tétrade). Cette forme extrêmement résistante permet aux

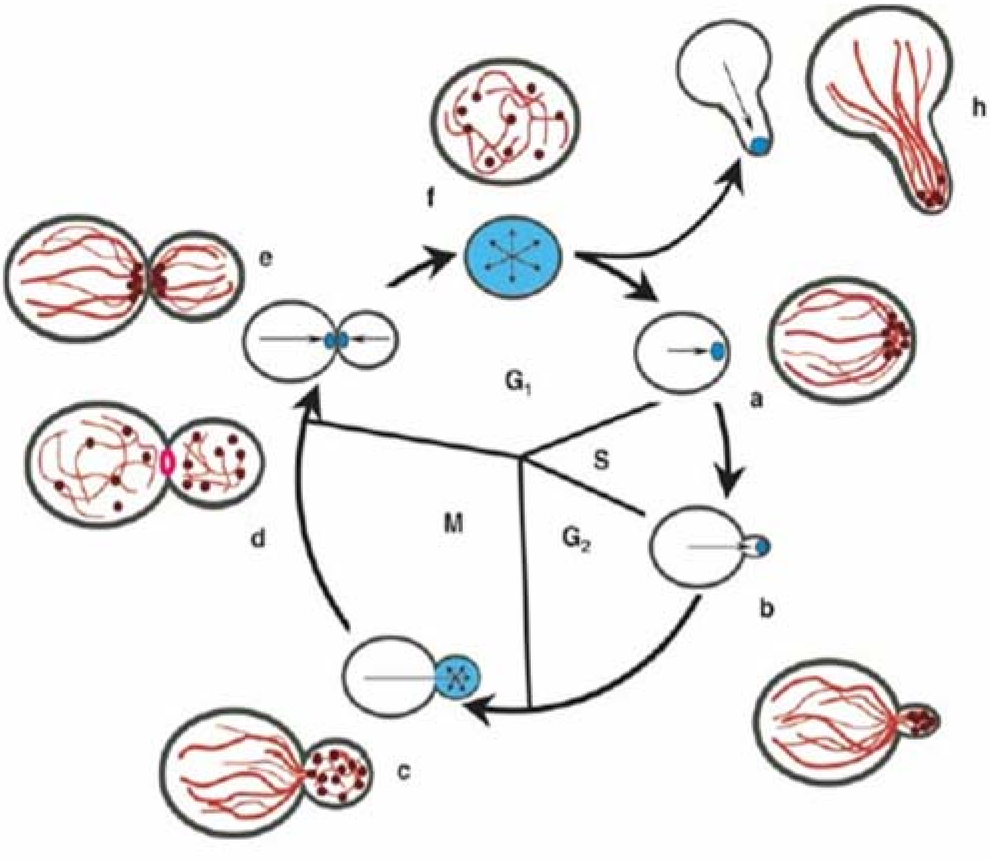


Figure 22. Organisation du cytosquelette d'actine durant le cycle cellulaire de *S. cerevisiae*.

Les points rouges représentent les taches corticales et les lignes les câbles d'actine. a) La cellule choisit son site de bourgeonnement. b) Il y a polarisation du cytosquelette d'actine vers le bourgeon pour qu'il y ait sécrétion de tous les éléments essentiels à sa croissance (apicale). c) Le bourgeon peut ensuite croître d'une manière isotropique. d) Lorsque la taille adéquate est atteinte, les taches corticales se répartissent dans la cellule mère et la cellule fille. e) Ils se retrouvent ensuite dans la plaque équatoriale et les câbles sont dirigés au travers. f) La nouvelle cellule peut alors croître d'une manière isotropique. h) Lorsque la cellule forme un shmoo lors de la conjugaison, les taches corticales se retrouvent à l'extrémité de l'excroissance et les câbles y sont orientés. Adaptée de Pruyne et Bretscher, 2000b.

cellules de survivre en attendant que les conditions du milieu redeviennent favorables. Lorsque les nutriments sont de nouveau disponibles, les spores de chaque tétrade germent pour former des cellules haploïdes qui vont se multiplier (Figure 21). Le mode de bourgeonnement est différent selon la ploïdie des cellules. Les cellules haploïdes bourgeonnent toujours au même pôle (bourgeonnement axial) tandis que les cellules diploïdes bourgeonnent alternativement à chaque pole de la cellule (bourgeonnement bipolaire).

Les levures possèdent un système génique dit « sexuel » composé de deux types différents : MATa et MATα encore appelés signes sexuels. Les cellules diploïdes possèdent deux signes simultanément. Les cellules haploïdes n'en possèdent qu'un seul leur permettant de sécréter une phéromone différente selon qu'elles sont MATa ou MATα. Ainsi, lorsque deux cellules haploïdes de signe sexuel opposé sont stimulées par les phéromones, elles forment chacune une projection (« shmoo ») vers le partenaire sexuel et fusionnent pour donner un zygote à la formation du premier bourgeon. Ensuite les noyaux fusionnent pour donner une cellule diploïde. Ce processus s'appelle la conjugaison (Figure 21).

B. Organisation et fonctions du cytosquelette d'actine chez la levure

1) Organisation du cytosquelette d'actine au cours du cycle cellulaire

La levure possède trois structures contenant des microfilaments : les câbles d'actine, l'anneau contractile d'acto-myosine et les taches corticales d'actine. On peut les distinguer lors de la division cellulaire par bourgeonnement (Adams and Pringle, 1984). Les câbles sont constitués de microfilaments réunis ensemble parallèlement et les taches corticales d'actine ou « patches » sont des petits foci formés d'un réseau de microfilaments et de nombreuses autres protéines associés à la membrane plasmique. Les microfilaments sont également retrouvés dans l'anneau contractile lors de la cytocinèse (Amberg, 1998; Bi *et al.*, 1998; Lippincott et Li, 1998).

Comme le montre la figure 23, ces structures ont une localisation polarisée au cours du cycle cellulaire (pour revue : Pruyne et Bretscher, 2000a). Lors de la croissance végétative, dans les cellules en phase G1, les taches corticales sont réparties dans toute la cellule et les câbles sont orientés au hasard. Après sélection du site de bourgeonnement, les taches corticales d'actine entourent le site d'émergence du bourgeon et les câbles

convergent vers ce site en s'orientant parallèlement à l'axe cellule mère/bourgeon (Figure 22). Les taches corticales d'actines restent à l'extrémité du bourgeon lors de sa croissance apicale puis se redistribuent aléatoirement dans le bourgeon lors de la croissance isotropique. Pendant ces phases, les câbles d'actine restent polarisés le long de l'axe cellule mère/cellule fille. En fin de phase M, les taches corticales d'actine et les câbles sont distribués aléatoirement entre la cellule mère et la cellule fille. L'anneau d'acto-myosine se forme au niveau de l'étranglement de la cellule fille, se contracte puis se désassemble. Après cette étape de cytocinèse, les taches corticale et les câbles des cellules mères et filles se repolarisent au niveau du site de division afin de permettre la synthèse de la paroi entre les deux nouvelles cellules.

Lors de la conjugaison, les taches corticales se concentrent à l'extrémité des projections et les câbles d'actine convergent vers cette extrémité (Figure 22). Après la formation du zygote, les taches corticales et les câbles sont polarisés vers la nouvelle cellule diploïde qui se forme au centre entre les deux cellules haploïdes.

Les trois différentes structures mentionnées sont constituées d'actine F en association avec un nombre important d'autres protéines. Les câbles d'actines contiennent, entre autres, de la tropomyosine –Tpm1 et 2p - et de la fimbrine, Sac6p. Les taches corticales sont constituées par de nombreuses protéines telles que le complexe Arp2/3, Las17p, Vrp1p, Abp1p, Pan1p, Sla1p, Sac6p, etc. (pour revue : Ayscough, 1998; Pruyne et Bretscher, 2000a). Ces protéines sont étroitement impliquées dans l'assemblage, l'organisation et/ou la fonction des différentes structures d'actine F qu'elles constituent. L'anneau de cytocinèse est constitué principalement d'actine F et de Myo1p mais aussi de septines et de Iqg1p et des formines (pour revue : (Bi, 2001)).

2) Fonctions de l'actine chez la levure

La production de mutants conditionnels du gène *ACT1* a permis de mieux comprendre les fonctions du cytosquelette d'actine chez la levure. Ainsi Novick et Botstein (1985) ont mis en évidence que des mutations (*act1-1* et *act1-2*) provoquaient de nombreux phénotypes différents dans les cellules : dépolarisation du cytosquelette d'actine, accumulation de structures aberrantes d'actine, arrêt de la croissance du bourgeon, défauts de cytocinèse, dépôt aléatoire de chitine dans la paroi, défaut de sécrétion, osmosensibilté des cellules, bourgeonnement aléatoire des cellules diploïdes, etc. Ces défauts impliquent le cytosquelette d'actine dans de nombreux processus cellulaires tels que la croissance polarisée, le trafic intracellulaire, la cytocinèse et la synthèse de la paroi. D'autres études sur l'actine et ces protéines associées ont également démontré le rôle du cytosquelette d'actine lors de l'étape d'internalisation de

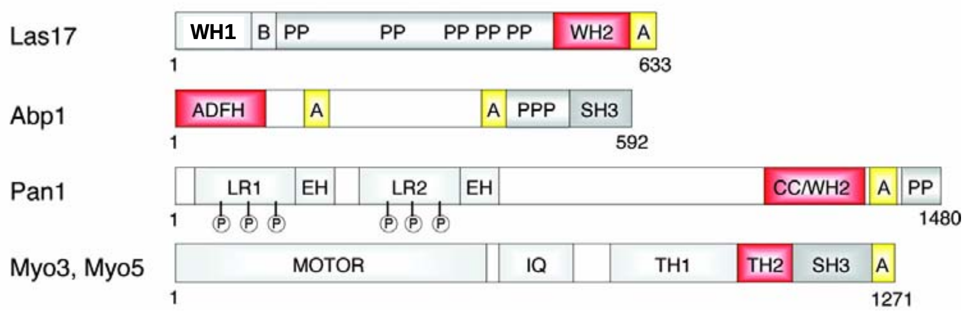


Figure 23. Les cinq NPFs de levure. Le domaine de liaison à l'actine proposé pour chaque NPF est coloré en rouge ; les domaines acides sont en jaune. Las17p lie l'actine G tandis que Abp1p, Pan1p, et Myo3/5p lient spécifiquement l'actine F. Pan1p contient plusieurs sites consensus de phosphorylation par Ark1/Prk1p dans LR1 et LR2 (indiqués par des P entourés).
A : acide ; B : basique; CC : coiled-coil ; EH : Eps15 homology ; IQ : liaison IQ ; LR : longue répétition ; PP ou PPP : polyproline ; SH3 : Src homology 3 ; TH1/2 : tail homology 1/2 ; WH1/2 : WASp homology 1/2.
Adaptée de Moseley et Goode, 2006.

l'endocytose (Kubler et Riezman, 1993), et le transport des organites tels que les mitochondries, la vacuole et le noyau (Symons *et al.*, 1996) ainsi que dans le transport polarisé d'ARNm vers le bourgeon et de la différenciation des cellules lors de la conjugaison (Cali *et al.*, 1998). De manière générale, le cytosquelette d'actine assure la polarisation de la croissance chez *Saccharomyces cerevisiae*. Chacune des trois structures d'actine F semble exercer des fonctions différentes. Ainsi, les câbles d'actines, assemblés par les formines, sont impliqués principalement dans le transport polarisé des cargos dans le bourgeon. Ces cargos sont les vésicules de sécrétion, les organites ou certains ARNm. Les taches corticales d'actine semblent être impliquées spécifiquement dans l'endocytose ainsi que dans la synthèse de la paroi cellulaire. Je décrirais plus en détail les fonctions des taches corticales d'actine dans l'endocytose dans la section suivante. Quant à l'anneau d'acto-myosine localisé au col du bourgeon, il assure la contraction nécessaire à la cytocinèse menant à la séparation de la cellule mère et de la cellule fille (Bi *et al.*, 1998; Lippincott et Li, 1998).

3) Assemblage de l'actine dans les différentes structures

a) Les taches corticales d'actine : le complexe Arp2/3

L'assemblage des filaments d'actine dans les taches corticales est dépendant du complexe Arp2/3 (cf section I.C.1) qui peut être régulé par au moins cinq facteurs stimulant la nucléation, les NPFs : Las17p, Pan1p, Myo3p, Myo5p et Abp1p (Duncan *et al.*, 2001; Evangelista *et al.*, 2000; Goode *et al.*, 2001; Lechler *et al.*, 2000; Winter *et al.*, 1999a). Chaque NPF possède un domaine acide qui facilite la liaison avec le complexe Arp2/3, probablement avec les sous-unités Arp3p et ARPC1 (Figure 23) (Kelly *et al.*, 2006; Kreishman-Deitrick *et al.*, 2005; Pan *et al.*, 2004; Weaver *et al.*, 2002). De plus, Las17p lie l'actine G alors que Myo3, Myo5p, Pan1p et Abp1p lient l'actine F. Pour Las17p, Pan1p et Abp1p, la liaison à l'actine est critique pour leur activité en tant que NPF (Quintero-Monzon *et al.*, 2005; Rodal *et al.*, 2003; Toshima *et al.*, 2005). Ceci permet de supposer que les NPFs liant les monomères d'actine comme Las17p, présentent leur sous-unité d'actine liée à la surface du complexe Arp2/3 pour faciliter la nucléation et les NPFs liant les filaments d'actine permettent de recruter le complexe Arp2/3 sur le côté de filaments préformés pour stimuler la nucléation.

Les cinq NPFs colocalisent partiellement avec le complexe Arp2/3 et leur première fonction est d'activer l'assemblage de l'actine médié par le complexe Arp2/3. Cependant, chaque NPF arrive à une étape différente dans le développement des taches corticales

(voir section suivante), ceci suggère qu'ils agissent séquentiellement et ou à des sites différents sur le complexe Arp2/3 (Kaksonen *et al.*, 2003).

Las17p/Bee1p ne possède pas de domaine GBD et ne se lie pas directement aux GTPases de type Rho (Li, 1997). *In vitro*, Las17p purifiée est active, suggèrenat qu'elle n'est pas auto-inhibée, et peut promouvoir l'assemblage de l'actine médiée par le complexe Arp2/3 de manière constitutive (Rodal *et al.*, 2003). Deux ligands connus de Las17p, Sla1p et Bbc1p (Li, 1997; Tong *et al.*, 2002) inhibent directement Las17p mais sans abolir son activité (Rodal *et al.*, 2003). Las17p n'étant pas autoinhibée comme les protéines WASPs contenant un GBD, son activité serait contrôlée par transinhibition. De plus, Las17p a de nombreux ligands qui peuvent contribuer à sa transinhibtion et à la levée de celle-ci (Goode et Rodal, 2001) : Vrp1p (homologue de WIP) (Evangelista *et al.*, 2000; Lechler *et al.*, 2000; Madania *et al.*, 1999; Vaduva *et al.*, 1997) et Rvs167p, Lsb1p, Lsb2p, Pin3p/Lsb3p, Ysc84p/Lsb4p et Bzz1p (Madania *et al.*, 1999; Tong *et al.*, 2002). Bzz1p recrute Las17p et la machinerie nécessaire à la polymérisation de l'actine (Soulard *et al.*, 2002). Récemment, il a été montré que Bzz1p est capable d'activer Las17p via ses domaines SH3 en levant l'inhibition due à Sla1p via ses domaines SH3 (Sun *et al.*, 2006). Cependant il reste à déterminer comment ces différents facteurs contrôlent temporellement l'activité de Las17p aux différentes étapes de la formation des taches corticales d'actine et ailleurs dans d'autres étapes du trafic intracellulaire.

Pan1p est recruté aux taches corticales précoces avec Las17p, avant l'arrivée du complexe Arp2/3 et la détection d'actine filamenteuse. Il serait recruté par ses interactions avec End3p, Sla1p et/ou les adaptateurs de la clathrine (Tang *et al.*, 1997; Tang *et al.*, 2000; Wendland et Emr, 1998).

Myo3p et Myo5p sont des myosines redondantes de type I. Ces protéines contiennent un domaine N-terminal moteur, un domaine TH1 (Tail homology) de liaison aux lipides, un domaine de liaison à l'actine F, un domaine SH3 et un motif A de liaison au complexe Arp2/3 (Figure 23). Leur activité NPF nécessite des interactions avec Vrp1 qui se lie à l'actine G (Anderson *et al.*, 1998; Evangelista *et al.*, 2000; Geli *et al.*, 2000; Lechler *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 1996). De plus, il a été proposé que Myo3p et Myo5p fonctionnent dans un grand complexe avec Las17p. Récemment Sun *et al.* (2006) ont montré qu'il était possible de séparer l'activité NPF et l'activité motrice de Myo5p et que l'activité motrice est nécessaire pour induire les mouvements du manteau endocytique vers l'intérieur de la cellule lors des dernière étapes de développement des taches corticales.

L'activité NPF de Abp1p (actin binding protein 1), protéine similaire à la cortactine de mammifères (Uruno *et al.*, 2001; Weaver *et al.*, 2001), requiert non seulement ses deux motifs acides mais aussi son domaine ADFH (ADF/cofilin homology) qui lie l'actine F avec

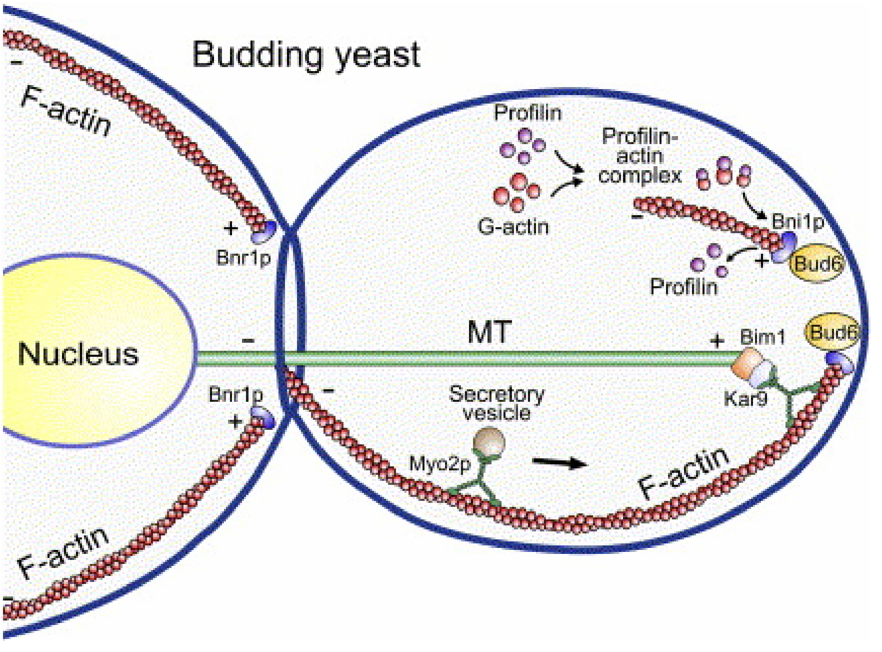


Figure 24. **Régulation de la polarité cellulaire par les formines**. Les deux formines Bni1p et Bnr1p contrôlent la polymérisation de l'actine localisée à la pointe du bourgeon et au col d'étranglement entre le bourgeon et la cellule mère, respectivement. Le facteur de polarité cellulaire Bud6p stimule directement l'activité de Bni1p. La polymérisation de l'actine induite par les formines est requise pour le transport de vésicules de sécrétion, médié par Myo2p, le long des filaments d'actine dans le bourgeon pour apporter les composés au site de croissance cellulaire polarisée. Ce système de transport basé sur les myosines de type V est aussi employé pour livrer les protéines des extrémités (+) des microtubules, Bim1p et Kar9p, et pour la stabilisation des microtubules polarisés au cortex cellulaire durant la division mitotique. Adaptée de Faix et Grosse, 2006.

une affinité de l'ordre du micromolaire (Goode et Rodal, 2001). Ces propriétés permettent à Abp1p de recruter le complexe Arp2/3 sur le côté de filaments préexistants avec une modeste activité de NPF.

La coronine, une protéine conservée du cytosquelette d'actine, localise au niveau des sites d'assemblage dynamique de l'actine (pour revue : De Hostos, 1999). La coronine est une des rares protéines capables d'interagir avec l'actine F et les microtubules établissant un lien entre ces deux structures (De Hostos, 1999). Chez S. *cerevisiae,* la coronine ou Crn1p, est capable de se lier directement au complexe Arp2/3, via des interactions entre un motif « coiled-coil » de Crn1p et la sous unité ARPC2. Cette interaction inhibe directement la nucléation de l'actine par le complexe Arp2/3 (Humphries *et al.*, 2002).

b) Les câbles d'actines : les formines

Les câbles d'actine sont des structures dynamiques complexes formées de longs filaments d'actine associés parallèlement. Des mutations affectant différentes sous-unités du complexe Arp2/3 empêchent l'assemblage des taches corticales mais n'affectent pas la formation des câbles et de l'anneau cytocinétique (Winter *et al.*, 1999b). Des études ont mis en évidence le rôle important des formines lors de l'assemblage des câbles d'actine (pour revue : Faix et Grosse, 2006) (Figure 24). Les formines appartiennent à une famille de protéines très bien conservées chez toutes les cellules eucaryotes. Chez la levure S. *cerevisiae,* ce sont Bni1p et Bnr1p, deux protéines partiellement redondantes impliquées dans la polarité cellulaire (pour revue : Sawin, 2002). Toutefois, des études récentes démontrent que les deux formines ne sont pas colocalisées et qu'elles ont chacune une fonction propre. Bni1p est localisée à l'extrémité du bourgeon et est responsable de la formation des filaments d'actine spécifiquement au bourgeon tandis que Bnr1p est plutôt localisée à la base du bourgeon et est responsable de la nucléation des filaments d'actine de la cellule mère. Cependant, les deux formines sont requises pour la division cellulaire (Moseley et Goode, 2005). Ces protéines se localisent au niveau des sites de croissance polarisée et elles interagissent avec les GTPases de type Rho telle Cdc42p (Evangelista *et al.*, 1997; Ozaki-Kuroda *et al.*, 2001).

Dans la portion C-terminale des formines on retrouve des domaines très conservés, FH1 et FH2 (formin homology domain 1 et 2). Le domaine FH2 permet la nucléation de l'actine à partir des monomères d'actine-G et reste associé à l'extrémité (+) du filament d'actine pour promouvoir l'élongation contrairement au complexe Arp2/3 et ce, même en présence de protéines de coiffe. Le domaine FH1 contient une région riche en proline qui s'associe à la profiline, une protéine de liaison aux monomères d'actine, et participe à la

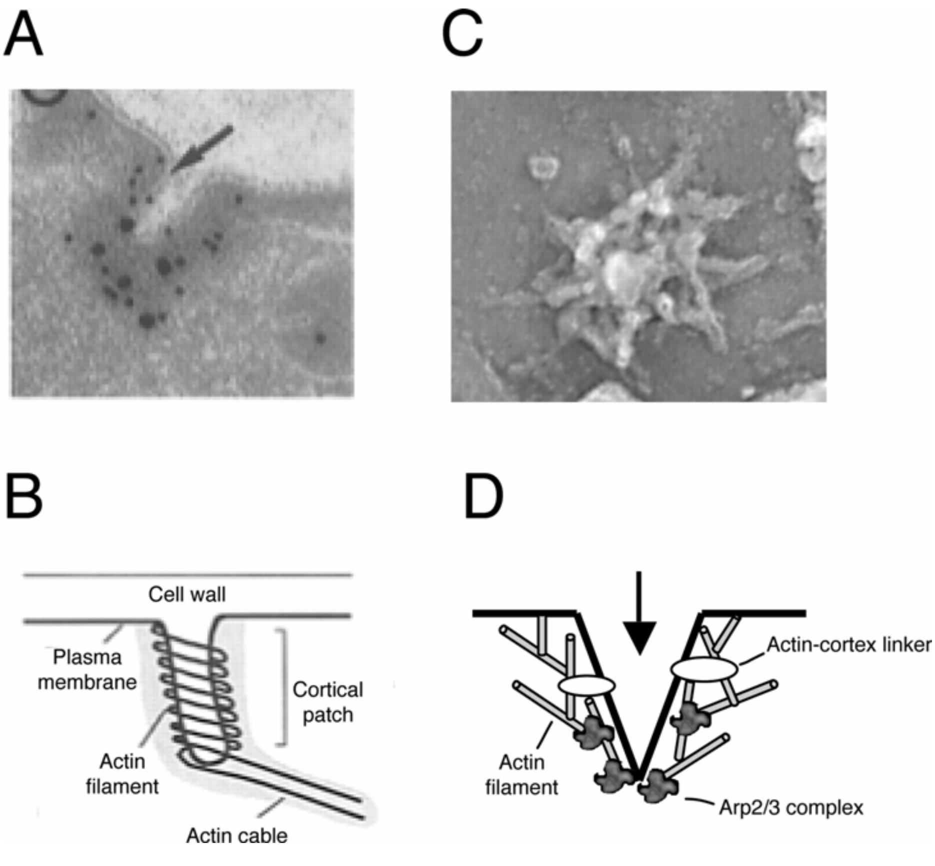


Figure 25. Ultrastructure des taches corticales d'actine par microscopie électronique. (A) Des invaginations de la membrane sont enrichies en actine (immunomarquée avec des particules d'or de 10 nm : fléche) et en Abp1p (immunomarquée avec des particules d'or de 20nm). (B) Modèle d'organisation des filaments d'actine aux taches corticales basé sur l'image (A). (C) Les filaments d'actine au cortex cellulaire sont organisés en réseaux filamenteux ramifiés ayant une forme de cône. (D) Modèle d'organisation des filaments d'actine aux taches corticales basé sur l'image (C).
A et C de Mulholland *et al*, 1997; C et D de Rodal *et al*, 2005.

nucléation de l'actine en collaboration avec le domaine FH2. En plus de la profiline, il a été démontré que la protéine Bud6p interagissait avec la portion C-terminale de Bni1p pour favoriser la nucléation par Bni1p mais pas par Bnr1p. Bud6p échange de l'ADP pour de l'ATP sur les monomères d'actine tout comme la profiline (Moseley et Goode, 2005).

C. Taches corticales d'actine et endocytose

Une excellente revue de Moseley et Goode (2006) présentent le cytosquelette d'actine dans la levure bourgeonnante.

De multiples composants des taches corticales d'actine on été identifiés dans des cribles aléatoires de mutants défectueux dans l'endocytose, Act1p, ARPC2, Rvs167p, Sac6p, Sla2p et Vrp1p (Chvatchko *et al.*, 1986; Dulic et Riezman, 1989; Engqvist-Goldstein et Drubin, 2003; Kubler et Riezman, 1993; Munn *et al.*, 1995; Raths *et al.*, 1993; Riezman, 1985). Des défauts dans l'endocytose en phase fluide de Lucifer Yellow après traitement des cellules avec la latrunculine A (Lat-A), un agent séquestrant les monomères d'actine, montre que l'actine est impliquée dans l'endocytose (Ayscough *et al.*, 1997). De plus des mutants affectant de nombreux composants des taches corticales montrent une accumulation dans les vésicules post-Golgi (Harsay et Bretscher, 1995; Li, 1997; Mulholland *et al.*, 1997). Cela suggère un lien temporel et spatial entre l'endocytose et l'exocytose.

1) Ultrastructure

Des observations en microscopie électronique ont révélé que les taches corticales d'actine s'associent avec des invaginations comme des doigts (des sites potentiels d'endocytose) à la membrane plasmique (Mulholland *et al.*, 1994) (Figure 25A et B). Une récente étude de Rodal *et al.* (2005a) a fourni des informations tridimensionnelles complémentaires de l'ultrastructure des taches corticales. La figure 25C et D montrent que les structures ont une forme de cône, avec le complexe Arp2/3 positionné à l'apex et il semblerait qu'il y ait une relation entre ces monticules d'actine et les invaginations en forme de doigt. Young *et al.* (2004) ont montré que les filaments d'actine dans des taches corticales d'actine partiellement purifiées forment un réseau ramifié où les filaments ont une polarité uniforme. Ces observations et celles *in vivo* de Rodal *et al.* (2005b) suggérant que le complexe Arp2/3 (qui lie les extrémités (-) des filaments) est à l'apex des taches corticales en forme de cône ; il semblerait que la majorité des extrémités (+) des filaments d'actine dans les taches corticales soit orientée vers le cortex cellulaire.

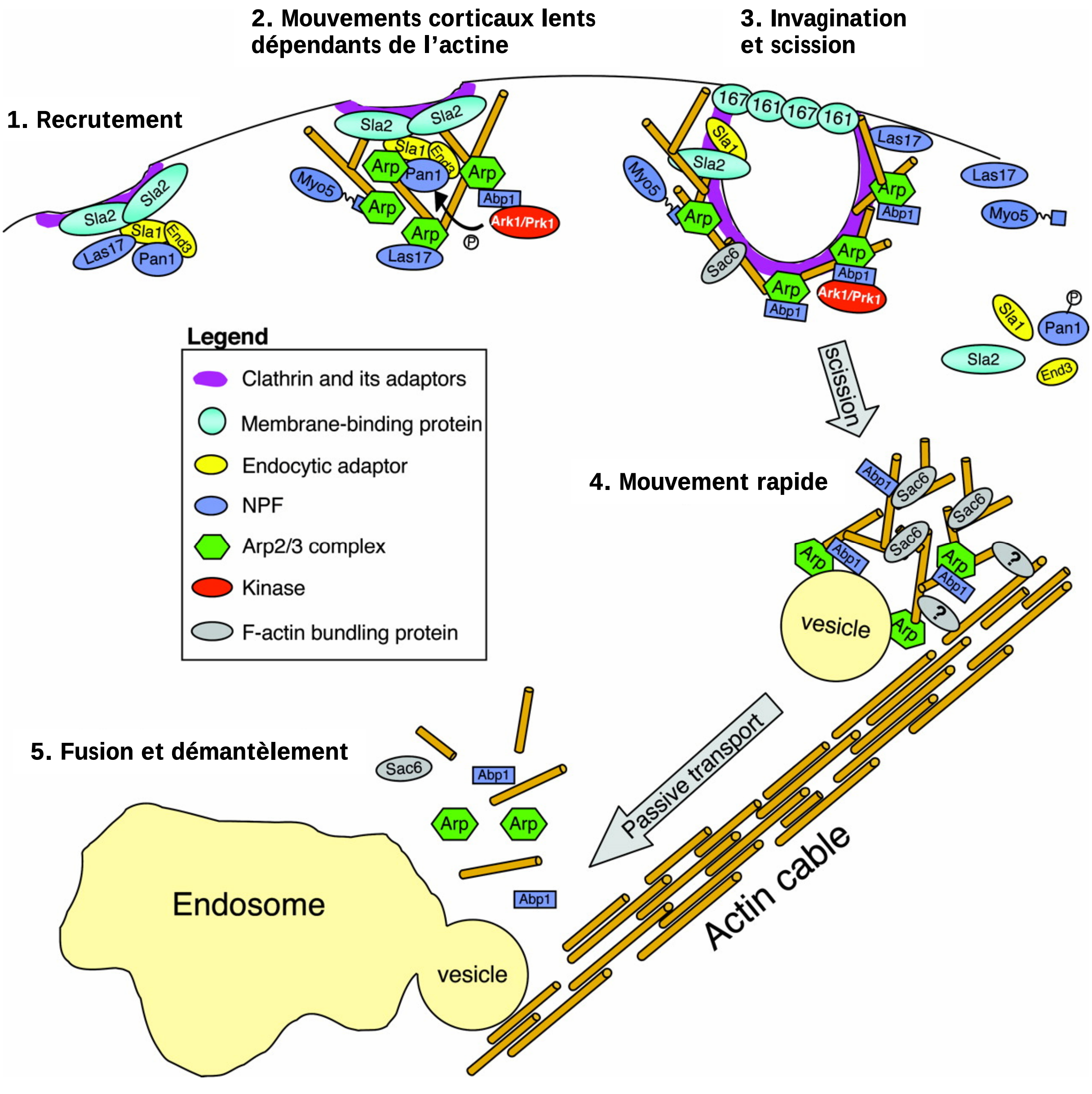


Figure 26. Modèle pour le développement des taches corticales d'actine. (Etape 1) Les récepteurs recrutent des composants précoces des « patches », incluant la clathrine, des adaptateurs et 2 NPFs Pan1p et Las17p au cortex cellulaire pour former des complexes relativement immobiles. (Etape 2) Pan1p et Las17p recrutent et activent le complexe Arp2/3 pour nucléer l'assemblage de l'actine, menant à un mouvement lent des « patches » au cortex. Pendant cette étape, 3 NPFs additionnels sont recrutés, Abp1p et Myo3/5p. Abp1p à son tour, recrute les kinases régulant l'actine, Ark1p et Prk1p, qui phosphorylent Pan1p. La phosphorylation inhibe l'activation du complexe Arp2/3 par Pan1p et provoque une dissociation du complexe Pan1 (Pan1p, End3p et Sla1p). (Etape3) La phosphorylation de Pan1p et/ou les activités de Rvs161p, Rvs167p et des myosines de type I Myo3p et Myo5p provoquent la scission des vésicules et leur internalisation. Le complexe Arp2/3, Abp1p, Sac6p, Cap1/Cap2p maintiennent l'association avec les vésicules internalisées. Certains composants précoces des « patches » restent au cortex cellulaire (Las17p, Pan1p, Sla1p, Sla2p, Myo3p et Myo5p. (Etape 4) Les vésicules endocytiques s'associent avec des câbles d'actine par un mécanisme inconnu et bougent passivement avec le flux rétrograde des câbles d'actine. (Etape 5) Les vésicules associées aux câbles fusionnent avec les compartiments endosomaux avec un désassemblage concomitant du manteau d'actine.
Adaptée de Moseley et Goode, 2006.

2) Modèle pour le développement des taches corticales d'actine et leur fonction

Un modèle récent de développement des taches corticales d'actine et d'endocytose provient des excellentes revues de Moseley et Goode (2006) et Toret et Drubin (2006), il est présenté dans la figure 26. Ce modèle est basé en particulier sur les résultats obtenus par Kaksonen *et al.* (2003; 2005) et par Huckaba *et al.* (2004). Ce modèle est constitué de cinq étapes :

1. **Recrutement précoce.** Il y a deux possibilités pour cette étape : soit des régions cytosoliques de récepteurs membranaires, modifiées par des kinases ou des ubiquitine-ligases, s'associent à la machinerie endocytique (Hicke, 1999; Howard *et al.*, 2002; Roth et Davis, 2000; Shih *et al.*, 2000; Tan *et al.*, 1996) ; soit un complexe statique appelé éisosome (contenant Pil1p, Lsp1p et Sur7p) marque le futur site de la formation de taches corticales d'actine (Walther *et al.*, 2006). La machinerie endocytique initialement recrutée aux « patches » inclut la clathrine et de nombreuses protéines d'échafaudage et adaptateurs de la clathrine : Yap1801p et Yap1802p (homologues de AP180), Ent1p et Ent2p (homologues des epsines), Ede1p (homologue de Eps15R), Scd5p, Sla1p et Sla2p (Aguilar *et al.*, 2003; Gagny *et al.*, 2000; Henry *et al.*, 2003; Howard *et al.*, 2002; Newpher *et al.*, 2005). Ces protéines recrutent d'autres composants qui promeuvent l'assemblage de l'actine : Pan1p, End3p et Las17p qui forment un réseau complexe de facteurs interagissant. Pan1p et Las17p, deux NPFs, peuvent recruter directement et activer le complexe Arp2/3 pour activer la nucléation de l'actine.
2. **Etape intermédiaire dans le développement des taches corticales : motilité faible**. Cette étape commence quand les taches corticales précoces (marquées par Las17p, Pan1p, Sla1p et Sla2p) sont rejointes par la machinerie de nucléation de l'actine, c'est-à-dire le complexe Arp2/3 et trois nouveaux NPFs : Myo3p, Myo5p (myosines de type I) et Abp1p. A ce moment là, les « patches » subissent des mouvements lents et non directionnels dans le plan du cortex cellulaire. La cinétique de la polymérisation de l'actine à ce stade est de 0,05 à 0,1 µm/s (Kaksonen *et al.*, 2003; Kaksonen *et al.*, 2005) ce qui est plus lent que les mouvements rapides des taches corticales dépendants des câbles (0,3 µm/sec) (Huckaba *et al.*, 2004).
3. **Invagination et scission.** La transition vers cette troisième phase, dans laquelle les « patches »/vésicules bougent vers l'intérieur de la cellule, est corrélée avec le début d'une motilité rapide et directionnelle des taches corticales (Kaksonen *et al.*, 2003) qui simultanément perdent de nombreux composants précoces (Sla1p, Sla2p, Las17p,

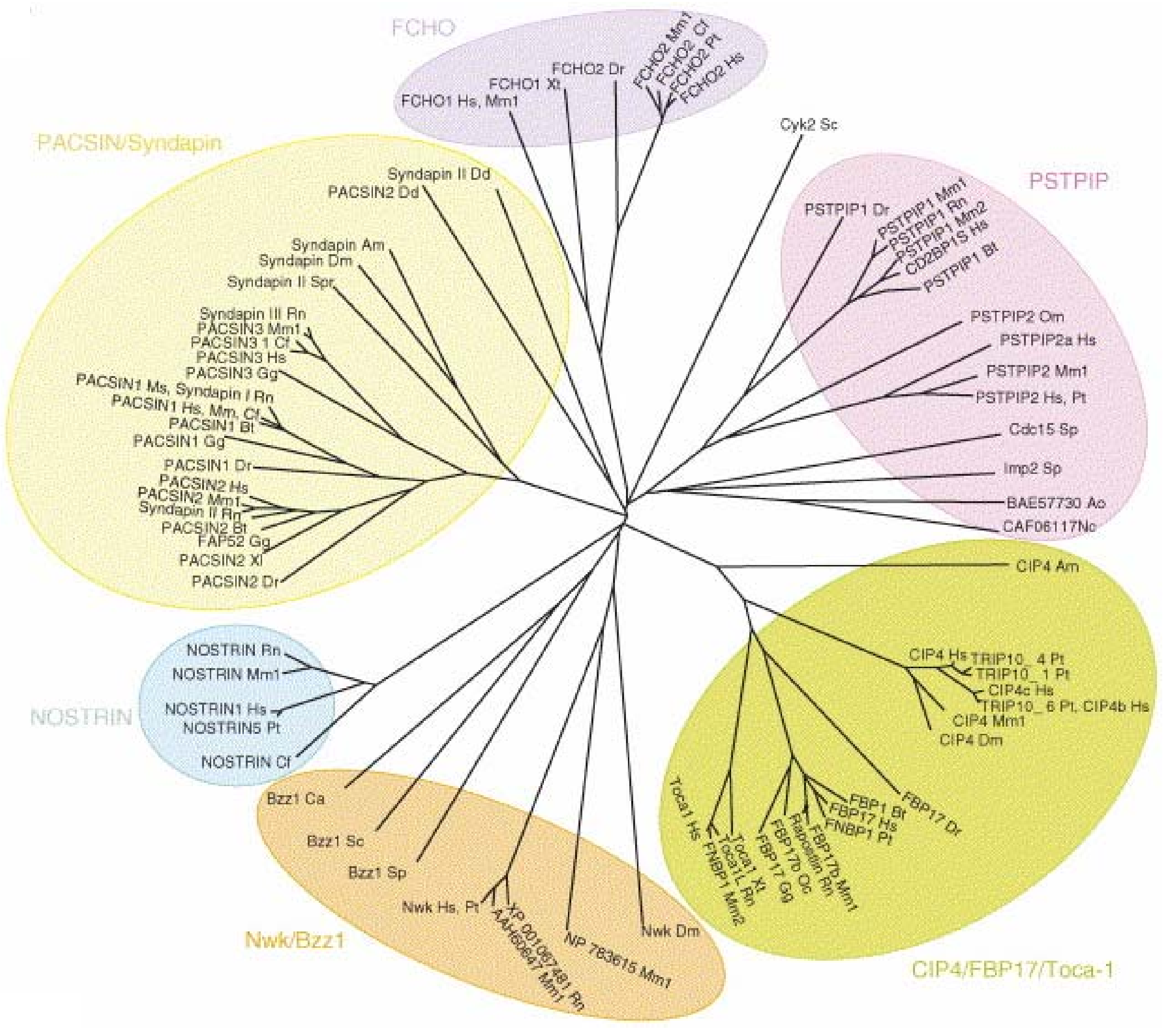


Figure 27. Dendrogramme de protéines PCH connues, sélectionnées par la présence de domaines FCH, CC et 0-2 SH3.

Cdc15, cell division cycle 15 ; **CIP4**, Cdc42-interacting protein 4 (ou thyroid hormone-interacting protein 10, TRIP10, ou human salt-tolerant protein, HSTP) ; **Cdc42**, cell division cycle 42 ; **Cyk2**, cytokinesis 2 (ou Hof-1) ; **FAP52**, focal adhesion protein 52 ; **FBP**, formin-binding protein ; **FCHO,** FCH only ; **FNBP,** formin-binding protein ; **Imp2,** increased maximal permissive temperature for Pim1 ; **NOSTRIN**, eNOS traffic inducer ; **Nwk,** nervous wreck ; **PACSIN,** protein kinase C and casein kinase 2 substrate in neurons ; **PSTPIP**, proline–serine–threonine phosphatase-interacting protein ; **Rapostlin,** apostle of Rnd2 (= small GTPase related to Rho in the effector domain) ; **syndapin,** synaptic dynamin-interacting protein ; **Toca-1**, transducer of Cdc42-dependent actin assembly.

Les abréviations des espèces suivant le nom de la protéine sont indiquées comme suit : **Am**, *Apis melifera* (abeille) ; **Ao**, *Aspergillus oryzae* (champignon) ; **Bt**, *Bos taurus* ; **Cf**, *Canis familiaris* ; **Dd**, *Dictyostelium discoideum* ; **Dm**, *Drosophila melanogaster*; **Dr**, *Danio rerio* (perche); **Gg**, *Gallus gallus* ; **Hs**, *Homo sapiens* ; **Mm1**, *Mus musculus* ; **Mm2**, *Macaca mulatta* ; **Nc**, *Neurospora crassa* (champignon) ; **Oc**, *Oryctolagus cuniculus* (lapin) ; **Om**, *Oncorhynchus mykiss* (truite); **Pt**, *Pan troglodytes* (chimpanzé) ; **Rn**, *Rattus norvegicus* ; **Sc**, *Saccharomyces cerevisiae* ; **Sp**, *Schizosaccharomyces pombe* ; **Spr**, *Strongylocentrotus purpuratus* (oursin); **Xl**, *Xenopus laevis* ; **Xt**, *Xenopus tropicalis*. Adaptée de Chitu et Stanley, 2007.

Pan1p, Myo3p et Myo5p). Les signaux provoquant cette transition ne sont pas connus mais il semblerait que les kinases Ark1p et Prk1p soient impliquées. Leur localisation au sein d'une tache corticales se fait par une association directe avec Abp1p et Sla2p et elles phosphorylent Sla1p et Pan1p et probablement d'autres composants (pour revue : Smythe et Ayscough, 2003). La phosphorylation de Pan1p par Prk1p inhibe sa capacité à se lier à l'actine et d'activer le complexe Arp2/3 (Toshima *et al.*, 2005). Las17p est perdu avant Pan1p (Kaksonen *et al.*, 2003), ce qui suggère que Las17p et Pan1p ont des rôles différents dans l'internalisation des vésicules. De plus des mutations de Bbc1p, End3p, Sla1p et Sla2p montrent la formation de protrusions d'actine (Kaksonen *et al.*, 2005) suggérant qu'ils peuvent contribuer à la régulation négative de l'assemblage de l'actine à cette étape et/ou promouvoir la libération des vésicules. Ce processus requiert aussi les protéines Myo3p, Myo5p, Rvs161p et Rvs167p qui sont impliquées dans la promotion de la scission membranaire (Jonsdottir et Li, 2004; Kaksonen *et al.*, 2005).

4. **Mouvement rapide.** Une fois, que les taches corticales/vésicules quittent le cortex cellulaire, elles bougent rapidement vers l'intérieur de la cellule le long des câbles polarisés d'actine. Le flux rétrograde (du bourgeon vers la cellule mère) des câbles semblent « porter » les « patches » vers les compartiments de tri des endosomes (Huckaba *et al.*, 2004). Il semblerait que ce transport soit passif ce qui suggère qu'il y ait un lien physique entre les « patches » et les câbles (Huckaba *et al.*, 2004). Les facteurs connus pour être associés aux taches bougeant rapidement sont Abp1p, le complexe Arp2/3, Cap1p/Cap2p et Sac6p (Huckaba *et al.*, 2004; Kaksonen *et al.*, 2003).
5. **Fusion et démantèlement.** Finalement il y a une étape de fusion de la vésicule nouvellement formée à un endosome et la tache est démantelée.

3) La famille PCH

a) Généralités

Les membres de la famille Pombe Cdc15 homology (PCH) sont des protéines multi-domaines qui servent d'adaptateur et ont des rôles essentiels pour rapprocher physiquement le cytosquelette d'actine et les membranes lors de l'endocytose (Kessels et Qualmann, 2004; Lippincott et Li, 2000). A l'exception des plantes, les gènes codant pour les protéines PCH ont été identifiés dans la plupart des eucaryotes (Figure 27). La protéine Cdc15 de *Schizosaccharomyces pombe*, impliquée dans la régulation de la division cellulaire, est le membre fondateur de cette famille (Fankhauser *et al.*, 1995). Les

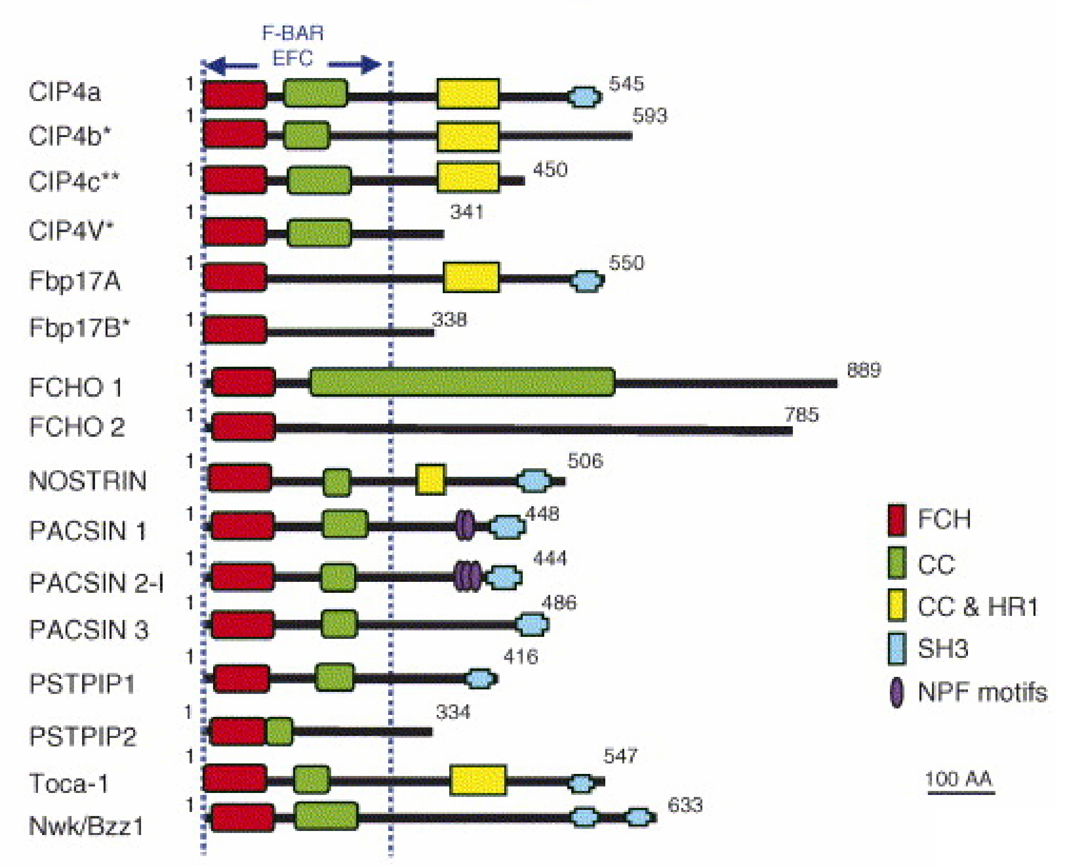


Figure 28. Structure primaire des domaines des protéines PCH. Cette famille est basée sur la structure de Cdc15 de *S. pombe***.** Les lignes pointillées délimitent le domaine EFC ou F-BAR. Les ARNm provenant d'un épissage alternatif du même gène sont indiqués avec un astérisque ; les variants générés par mutation sont indiqués par deux astérisques.
Abréviations: **CC**, coiled-coil; **FCH**, Fes/CIP4 homology domain; **HR1**, protein kinase C-related kinase homology region 1; **NPF**, Asn, Pro, Phe motifs et **SH3,** Src Homology 3. Une sous-classe des protéines PCH constituée de Bzz1p et Nwk et leurs orthologues ont deux domaines SH3.
Adaptée de Chitu et Stanley, 2007.

membres de cette famille ont peu de similarité de séquences mais partagent une architecture similaire de leurs domaines : une région dite FCH (Fes/Cip4 Homology) à l'extrémité N-terminale suivie d'une ou plusieurs régions « coiled-coil » (CC) souvent impliquées dans la dimérisation des protéines et un ou deux domaines SH3 à l'extrémité C-terminale (Figure 28) (Lippincott et Li, 2000). Récemment, Itoh *et al.* (2005) et Tsujita *et al.* (2006) ont montré que les domaines FCH et « coiled-coil » sont probablement une seule unité qui possède des similarités structurales et fonctionnelles avec le domaine BAR (Bin/Amphiphysin/Rvs) présent, par exemple, dans des protéines endocytiques telles que l'endophiline, l'amphiphysine et qui est impliqué dans la déformation des bicouches lipidiques (Peter *et al.*, 2004). Ce domaine FCH étendu est défini soit comme un domaine FCH et BAR (F-BAR) (Itoh *et al.*, 2005) soit comme un domaine EFC (extended FER-CIP4) (Tsujita *et al.*, 2006) appelé par la suite F-BAR.

Le domaine F-BAR, chez les eucaryotes supérieurs, médie l'oligomérisation des protéines PCH et les interactions avec les phopholipides de la membrane (Itoh *et al.*, 2005; Tsujita *et al.*, 2006). Le(s) domaine(s) SH3 médient l'interaction avec des motifs riches en proline trouvés dans de nombreuses protéines comme la famille WASP et la dynamine (Cote *et al.*, 2002; Ho *et al.*, 2004; Icking *et al.*, 2005; Itoh *et al.*, 2005; Kamioka *et al.*, 2004; Kessels et Qualmann, 2004; Tian *et al.*, 2000). Chez certains membres de la famille, le domaine SH3 est absent (FCHO1, FCHO2 and PSTPIP2) ou certains isoformes spécifiques d'un tissu, provenant d'un épissage alternatif, sont avec ou sans le domaine SH3 (CIP4b, CIP4c, CIP4V, Fbp17b) (Figure 28). Le domaine SH3 confère aux protéines PCH leur spécificité fonctionnelle, d'où l'intérêt de connaître ses partenaires cellulaires. De plus, dans certaines protéines de la famille, des domaines de liaisons aux petites GTPases (HR1) sont présents, ces domaines interagissent avec les GTPases de type Rho telles que Cdc42, TC10 et Rnd2 (Aspenstrom, 1997; Chang *et al.*, 2002; Fujita *et al.*, 2002) (Figure 29). Les protéines de la famille PCH interagissent avec de nombreuses autres protéines, incluant des récepteurs, des adaptateurs, des enzymes et des protéines de structure pour réguler leur distribution cellulaire, leur organisation et leur activité (pour revue : Aspenstrom *et al.*, 2006; Chitu et Stanley, 2007; Lippincott et Li, 2000). A travers ces interactions, les protéines PCH régulent la morphologie cellulaire et la motilité, l'intégrité des organites, le trafic des protéines et l'organisation du cytosquelette d'actine. L'importance des protéines PCH a aussi été démontré par la découverte de mutations dans les gènes codant pour certains membres de cette famille tels que dans des syndromes neurodégénératifs, dans le cancer et dans la maladie auto-inflammatoire « pyogenic sterile arthritis, pyoderma gangrenosum and acne » (PAPA) (Endris *et al.*, 2002; McDermott, 2004; Megonigal *et al.*, 2000; Wise *et al.*, 2002).

b) Les protéines PCH dans la dynamique membranaire

De nombreux travaux impliquent les protéines PCH dans l'endocytose (Kessels et Qualmann, 2004). Le lien avec l'endocytose a d'abord été suggéré dans des études montrant que la dynamine lie les domaines SH3 de membres de la famille PCH (e.g. Syndapine I et CIP4) (Itoh *et al.*, 2005; Kessels et Qualmann, 2004; Tsujita *et al.*, 2006). Chez les mammifères, la dynamine est une GTPase qui a une fonction importante dans l'endocytose médiée par la clathrine (Schafer, 2004) ; elle catalyse l'excision de la bicouche lipidique invaginée et le bourgeonnement des vésicules depuis des membranes intracellulaires telles que la membrane de l'appareil de Golgi.

Il a été montré que FBP17 induit la formation d'invaginations tubulaires depuis la membrane plasmique (Kamioka *et al.*, 2004). Le domaine F-BAR est requis pour la formation des tubules mais pas le domaine SH3 de FBP17. De plus, Itoh *et al.* (2005) et Tsujita *et al.* (2006), ont montré que le domaine F-BAR de protéines comme CIP4 montrent une affinité pour les liposomes contenant de la phosphatidylsérine et des phosphoinositides. Le domaine FCH semble être important pour le ciblage des protéines PCH aux liposomes, mais la capacité de ces protéines à s'oligomériser d'une manière dépendante de la région « coiled-coil » est certainement la force motrice qui déforme les liposomes en structures tubulaires. Cependant, la fonction précise du domaine F-BAR reste à établir et il est possible que les différents domaines F-BAR aient différentes fonctions.

c) Les protéines PCH dans la régulation du cytosquelette

Les protéines PCH sont capables de communiquer avec les deux modules de polymérisation de l'actine : le complexe Arp2/3 - WASP et les formines. Je ne décrirai que les interactions avec le complexe Arp2/3-WASP. Les protéines PCH doivent probablement fonctionner comme des protéines adaptatrices qui recrutent des protéines avec diverses unités catalytiques dans des grands complexes protéiques. Par exemple, des protéines PCH, comme CIP4 et Toca-1, sont des effecteurs de Cdc42 (Aspenstrom, 1997; Ho *et al.*, 2004). Le meilleur lien établi avec la dynamique de l'actine est l'association des protéines PCH et WASP ou N-WASP (Soulard *et al.*, 2002). Le rôle de Toca-1 dans l'activation de WASP a été établi en détail (Ho *et al.*, 2004). Après stimulation des cellules, le complexe WIP - N-WASP se dissocie et Toca-1 est nécessaire à cette dissociation (Ho *et al.*, 2004). N-WASP libéré active alors la polymérisation nucléée par le complexe Arp2/3. Des GTPases de type Rho telles que Cdc42 peuvent altérer l'affinité de Toca-1 pour N-WASP et/ou pour WIP (Ho *et al.*, 2004). Le ciblage de Toca-1 à la membrane plasmique ou à des membranes internes par le biais du domaine F-BAR pourrait aussi altérer l'affinité de Toca-1 pour le complexe WIP–N-WASP.

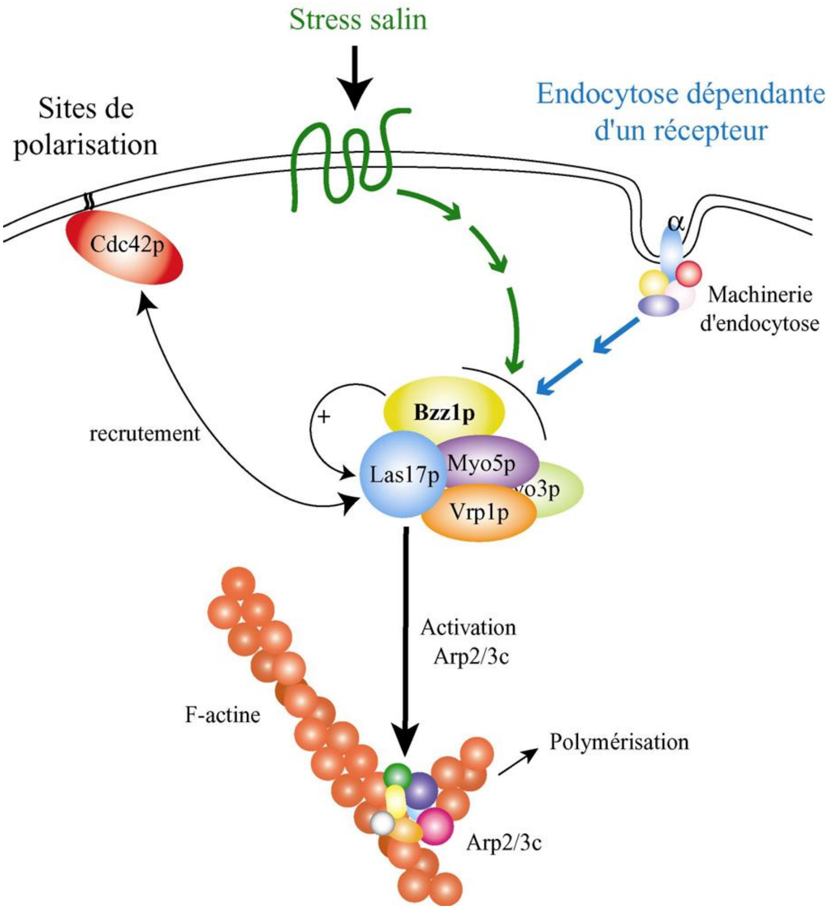


Figure 29. Modèle théorique du rôle de Bzz1p au sein du complexe Las17/Vrp1/Myo3/5p. Bzz1p est recrutée dans le complexe Las17/Vrp1/Myo3/5p qui est localisé au niveau des taches corticales d'actine. Au sein du complexe Bzz1p et Myo5p permettent ensemble d'établir un lien entre la voie de réponse au stress salin et la machinerie de polymérisation de l'actine (flèches vertes). Ces deux protéines interviennent également dans un processus reliant l'endocytose dépendante d'un récepteur et l'assemblage de l'actine (flèches bleues). Le complexe Las17/Vrp1/Myo3/5p active le complexe Arp2/3 qui nuclée la polymérisation de l'actine. Bzz1p active Las17p (+).
Adaptée de la thèse de Soulard, 2003.

d) Le cas de Bzz1p

Bzz1p possède un domaine FCH N-terminal (aa 5 à 110) suivi de deux régions « coiled-coil » (aa 130 à 210 et 305 à 355) et deux domaines SH3 C-terminaux (aa 500 à 554 et 583 à 633) (Figure 28). Au laboratoire, Alexandre Soulard (Soulard *et al.*, 2005; Soulard *et al.*, 2002) a montré pendant sa thèse que la surproduction de Bzz1p causait de sévères défauts de croissance. Las17p interagit directement avec Bzz1p par l'interaction des domaines SH3 de Bzz1p et du motif riche en proline de Las17p. La protéine Bzz1p en fusion avec de la GFP se localise dans les taches corticales d'actine d'une manière dépendante de Las17p mais indépendante de l'actine F. De plus, les domaines SH3 de Bzz1p sont capables de recruter la machinerie de polymérisation de l'actine dans un test *in vitro*. D'autre part, Bzz1p interagit avec Myo5p et ces deux protéines agissent ensemble dans la repolarisation du cytosquelette d'actine après un stress salin. Enfin la destination des cargos n'est pas affectée dans les souches *myo5Δ bzz1Δ* (Soulard *et al.*, 2005). A la fin de sa thèse, il a développé un modèle du rôle de Bzz1p dans le cytosquelette d'actine (Figure 29).

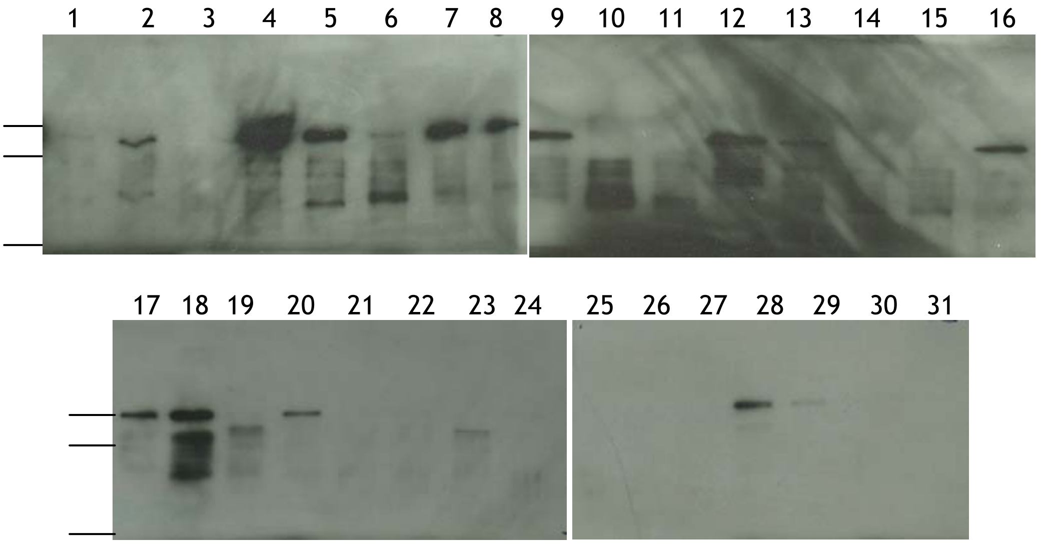
Très récemment, Sun *et al.* (2006) ont apporté des précisions sur le rôle de Bzz1p dans le développement des taches corticales d'actine. Bzz1p purifiée libère Las17p de son inhibition par les domaines SH3 de Sla1p de façon dose-dépendante. Cette levée d'inhibition requiert les domaines SH3 de Bzz1p. Ceci révèle un nouveau mécanisme pour l'activation d'une protéine de la famille WASP, dans laquelle l'inhibition de l'activité NPF par une protéine contenant un domaine SH3 est levée par une autre protéine contenant un domaine SH3. De plus, Bzz1-GFP reste associée à la membrane plasmique durant l'internalisation endocytique, comme Las17p (Sun *et al.*, 2006). D'autre part, il semblerait que Bzz1p soit recrutée aux taches corticales immédiatement avant que la polymérisation de l'actine soit initiée, ce qui est cohérent avec le fait que Bzz1p lève l'inhibition de Las17p par Sla1p. Ainsi Bzz1p est un composant endocytique qui pourrait être un lien entre l'assemblage de l'actine et la courbure des membranes.

III. Objectifs

Mon projet de thèse consistait à affiner la localisation et la dynamique de Bzz1p au sein du cytosquelette d'actine. En attendant de pouvoir utiliser notre nouvelle sonde photoactivable, j'ai voulu déterminer de nouveaux partenaires de Bzz1p afin de mieux appréhender son rôle dans le développement des taches corticales d'actine et éventuellement dans d'autres étapes du trafic intracellulaire. Comme Bzz1p fait partie de la famille PCH, ses partenaires potentiels peuvent être des protéines ou des lipides. Nous avons cherché parmi ces deux types de partenaires possibles. Dans le chapitre suivant, je décris les résultats obtenus dans cette recherche de nouvelles interactions pour Bzz1p.

Chapitre 2.

Résultats



1-Cdc25
2-Lsb1
3-Hse1
4-Sho1
5-Bzz1-1
6-Fus1
7-Bzz1-2
8-Pex13

9-Lsb2
10-Bud14
11-Naf1
12-Bbc1
13-Lsb3
14-Sdc25
15-Hof1
16-Myo3

17-Myo5
18-Rvs167
19-Nbp2
20-Abp1
21-Boi1
22-Boi2
23-Bem1-1
24-Bem1-2

25-Sla1-1
26-Sla1-2
27-Sla1-3
28-Lsb4
29-Myo5/Th2
30-vecteur vide
31-billes seules

Figure 30. Interaction des différents domaines SH3 avec Las17-GFP. Différents domaines SH3 en fusion avec la GST ont été produits dans E.coli et fixés sur billes GST-Sépharose. Un extrait protéique de levure issu d'une souche Las17-GFP a été incubé avec ces billes et les protéines ayant interagit avec les domaines fixés (« GST pulldown ») sont analysées par Western blot avec un anticorps anti-GFP.

Chapitre 2. Résultats

I. Recherche des interactions des domaines SH3

Lors de mes études de doctorat, j'ai pu participer à des travaux pour rechercher l'implication de Bzz1p dans le trafic intracellulaire ; ces résultats ont été publiés (Soulard *et al.*, 2005) et sont présentés en annexe 1. Dans ce travail, nous avons montré que Bzz1p en association avec Myo5p joue un rôle dans l'étape d'internalisation lors de l'endocytose mais ces deux protéines ne paraissent pas être requises ni pour le transport des cargos jusqu'aux vacuoles, ni pour le tri de la voie de signalisation du MVB (Multi Vesicular Body). La cinétique du transport n'a pas été examinée. Dans des travaux du laboratoire, nous nous intéressons à tester la capacité des 28 domaines SH3 de levure contenus dans 24 protéines, à induire ou non la polymérisation de l'actine dans ce test *in vitro*. Quelques résultats sont présentés dans une publication suite à un présentation dans un congrès (Mirey *et al.*, 2005) (annexe 2). Dans ce test développé par le laboratoire de Kirchner et utilisé par Geli *et al.* (2000) et par A. Soulard au laboratoire, un domaine protéique en fusion avec la GST produit dans *E. coli* est fixé sur billes de GSH-sépharose auquel on ajoute un extrait cellulaire de levure capable de fournir les éléments nécessaires à la polymérisation. Une source de renouvellement de l'énergie est ajoutée. L'actine couplée à un fluorophore est additionnée ce qui permet de visualiser la polymérisation au microscope à épifluorescence. Comme le test de fluorescence est variable selon la source de l'actine ajoutée et la manière de réaliser les extraits protéiques, une confirmation des interactions par une méthode biochimique indépendante a été utilisée.

De plus, une fois que les domaines SH3 en fusion avec la GST sont fixés sur les billes, il est possible d'incuber les billes avec les différents domaines en présence d'un extrait de levure (GST-pulldown) et ensuite d'analyser les protéines qui ont interagit avec le domaine fixé par transfert sur membrane ou Western blot. Nous avons utilisé un extrait protéique de levure d'une souche où la seule source de Las17 était fusionnée à la GFP (FY1679), ainsi il est aisé de révéler par western blot si Las17-GFP a interagi avec le domaine fixé sur les billes en utilisant un anticorps primaire anti-GFP. La Figure 30 montre que les domaines SH3 de Lsb1p, Sho1p, les deux domaines de Bzz1p, Fus1p, Pex13p, Lsb2p, Bbc1p, Lsb3p, Myo3p, Myo5p, Rvs167p, Abp1p et Lsb4p sont capables de lier Las17-GFP. Parmi ces protéines, il ya des activateurs connus de Las17p comme Bzz1p (Soulard *et al.*, 2002) mais aussi des inhibiteurs de Las17p comme Bbc1p (Rodal *et al.*, 2003). Ainsi le test de polymérisation peut permettre de tester si les domaines SH3 de protéines impliquées dans la régulation du cytosquelette d'actine sont capables d'activer la polymérisation ou

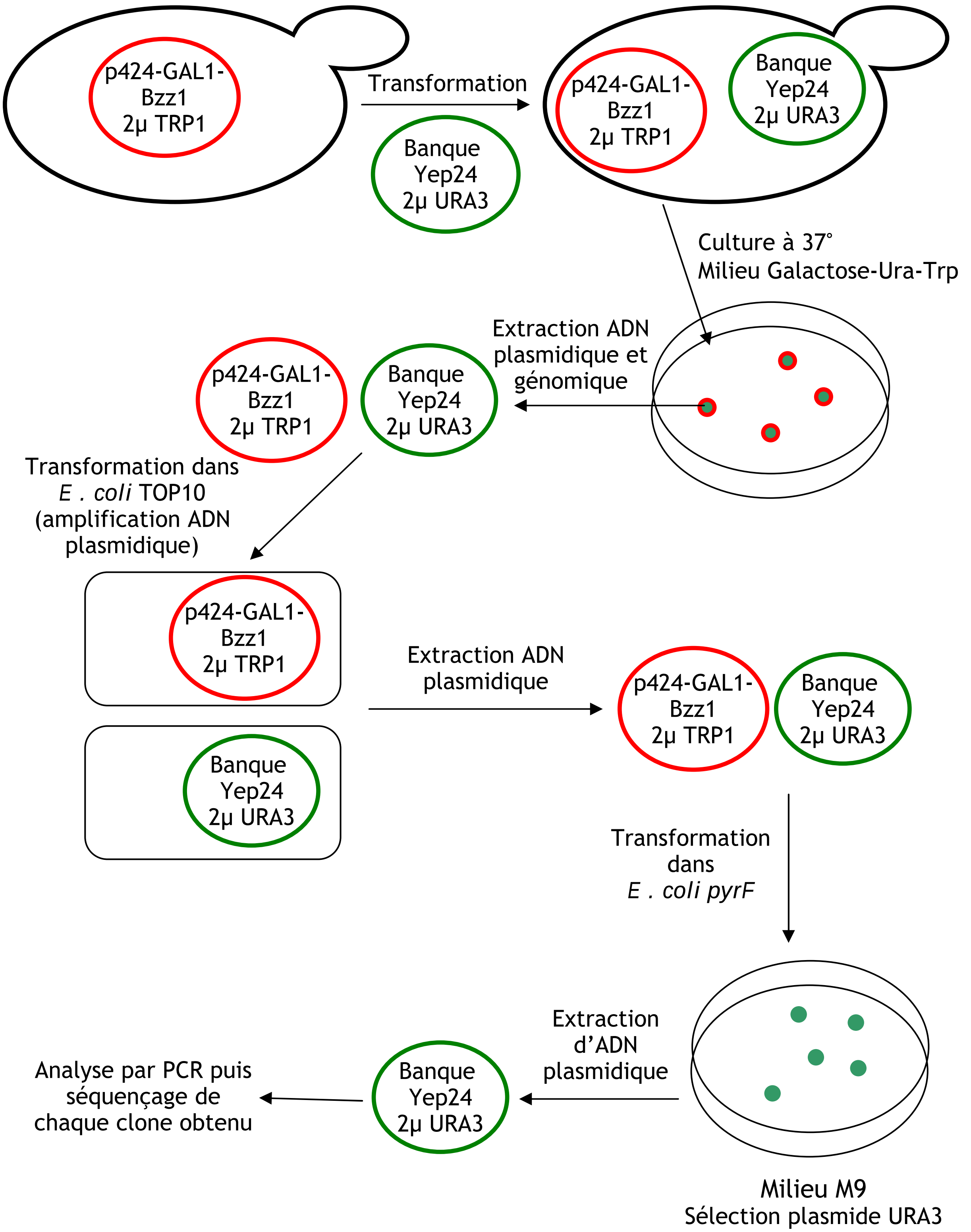


Figure 31. Principe du crible de surexpression.

au contraire de l'inhiber. Dans ce dernier cas, il est nécessaire d'utiliser des extraits protéiques de levure contenant un activateur connu de la polymérisation de l'actine fusionnée avec une protéine fluorescente, par exemple une GFP, ce qui permet une visualisation directe de l'interaction au microscope (Mirey *et al.*, 2005) ou par un Western blot en utilisant un anticorps anti GFP.

II. Crible de surproduction de Bzz1p

Au laboratoire, il avait été mis en évidence qu'une surproduction de Bzz1p dans des cellules de levure sauvages provoquait un ralentissement de la croissance à 25°C et un arrêt de croissance à 37°C (Soulard *et al.*, 2002). Afin de déterminer si ces défauts de croissance pouvaient être compensés par la surproduction d'une autre protéine, le plasmide de surexpression p424-GAL1-Bzz1 (construit par Alexandre Soulard) a été transformé dans la souche FY1679. Puis une banque d'ADN génomique clonée dans le site BamHI du vecteur 2 micron YEp24, permettant une forte production, a été transformée dans la souche FY1679 contenant p424-GAL1-Bzz1. Les cellules ont été étalées sur du milieu contenant du galactose pour surproduire Bzz1p et ont été mises en culture à 37°C afin de sélectionner les clones capables de pousser dans ces conditions de sélection (Figure 31). 28 clones ont ainsi été obtenus, leur ADN plasmidique a été isolé par un jeu de sélection dans différentes souches de bactéries. En effet, les deux plasmides, celui de Bzz1p et celui de la banque, codent pour des marqueurs auxotrophes différents pour la levure, *TRP1* pour p424-GAL1-Bzz1 et *URA*3 pour le vecteur de la banque, ce qui permet de sélectionner les levures contenant les deux plasmides. Ensuite, pour déterminer quel plasmide de la banque compensait la mort cellulaire provoquée par la surexpression de Bzz1p, il fallait isoler le plasmide de la banque en évitant le plasmide p424-GAL1-Bzz1. Comme ces deux plasmides codent pour le gène de résistance à l'ampicilline, nous avons transformé l'ADN plasmidique de chaque levure dans des souches bactériennes MC1066 ne métabolisant pas l'uracile afin de ne sélectionner que le plasmide de la banque (délétion *pyrF*). Or les souches MC1066 sont peu compétentes et donc difficiles à transformer directement avec de l'ADN plasmidique isolé de la levure. Il a alors fallu passer par une première transformation dans des cellules ultra compétentes les bactéries TOP10 pour isoler un ADN propre. Puis cet ADN a pu être transformé dans les bactéries MC1066 puis les clones obtenus ont été analysés pas PCR et séquencé. Parmi ces clones, deux possédaient de longs fragments d'ADN. Un clone possédait un fragment d'environ 2 kbases du chromosome XIII ayant les gènes *FMS1*, *MAC1* et *QRI8* (Fragment 1); l'autre clone possédait un fragment d'environ 8 kbases du chromosome III avec les gènes *PGS1*, *YCL002C*, *RER1*, *YCL001*, *YCR001W*, *CDC10*, *MRP32* et le centromère ARS308(Fragment 2).

Milieu	Glucose			Galactose		
T (°C)	25	30	37	25	30	37
Banque sans insert + p424-GAL1-vide	+	+	+	+	+	+
Banque sans insert + p424-GAL1-Bzz1	+	+	+	-	-	-
Banque Fragment 1 + p424-GAL1-vide	+	+	+	+	+	+
Banque Fragment 2 + p424-GAL1-vide	+	+	+	+	+	+
Banque Fragment 1 + p424-GAL1-Bzz1	+	+	+	-	-	-
Banque Fragment 2 + p424-GAL1-Bzz1	+	+	+	-	-	-

Tableau 6. Analyse des effets de la surproduction, sur galactose, des fragments 1 et 2 lors d'une surproduction de Bzz1p. + = croissance normale, - = pas de croissance

Afin de reproduire le phénotype de sélection de départ, l'ADN plasmidique de ces deux clones obtenus a été transformé dans la souche FY1679 possédant le p424-GAL1-Bzz1. La croissance des souches a été analysée par un test en goutte sur galactose à 37°C pour induire la surproduction (Tableau 6). Il s'est alors révélé que ces deux clones étaient des faux positifs puisque la mort cellulaire provoquée par la surproduction de Bzz1p n'était pas altérée par la surproduction de ces fragments d'ADN. En effet, aucun gène suppresseur de la toxicité due à la surproduction de Bzz1p n'a pu être identifié par ce crible.

III. Interactions protéine-protéines de Bzz1p

Lors de travaux antérieurs, Alexandre Soulard, avait utilisé la méthode du double-hybride, un système génétique permettant la détection d'interactions physiques entre deux protéines *in vivo*. D'après ce crible, Bzz1p est capable d'interagir avec les protéines Myo5p, Las17p, App1p, Ldb17p, Mec1p, Pma1p, Ubp7p, Ypl277Cp et Yor389Wp. Depuis des cribles génomiques double-hybride à grande échelle ont proposé un tellement grand nombre de partenaires potentiels que nous souhaitions utiliser une autre méthode pour trouver de nouveaux partenaires de Bzz1p, afin de préciser ses partenaires les plus directs rôle dans la cellule. Nous avons décidé d'utiliser une nouvelle méthode : le «ProtoArray™» (Invitrogen), une micropuce où a été déposé le protéome quasi-complet de *S. cerevisiae* (Zhu *et al.*, 2001).

A. Principe du «ProtoArray™»

4088 protéines sur les 4462 ORFs (phase ouverte de lecture ou « Open Reading Frame ») vérifiées contenues dans le protéome de la levure ont été étiquetées et produites dans *S. cerevisiae* sous forme de fusion GST-6xHis puis purifiées et déposées sur une lame en verre recouverte d'une membrane de nitrocellulose. Sur cette micropuce, la protéine d'intérêt purifiée, dans notre cas Bzz1p couplé à un épitope, peut alors s'hybrider directement avec des partenaires potentiels. Ensuite à l'aide d'un anticorps couplé à un fluorophore les interactions potentielles sont révélées par la lecture de la fluorescence de la lame à une longueur d'onde adaptée. En pratique, une étiquette protéique de six histidines a été ajoutée à Bzz1p ainsi que l'épitope V5. L'étiquette polyhistidine sert à la purification de la protéine, l'épitope V5, un épitope de 14 acides aminés (GKPIPNPLLGLDST) dérivé des protéines P et V du paramyxovirus, SV5 (Southern *et al.*, 1991), permet de révéler l'hybridation de la protéine à l'aide de l'anticorps anti-V5 couplé à l'AlexaFluor647. La figure 32 présente le protocole d'utilisation de la puce à protéine. Brièvement, les sites de liaison non spécifiques de la puce sont préalablement bloqués, puis la puce est incubée avec la protéine d'interêt, Bzz1p. Les interactions entre une

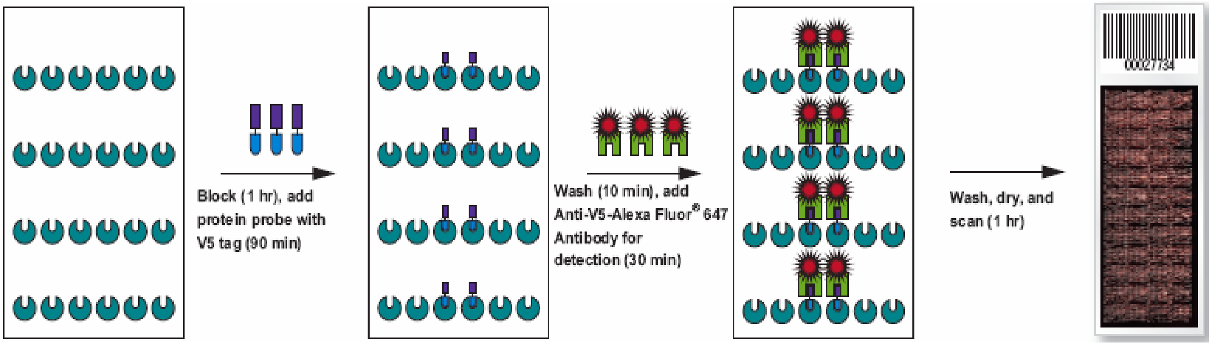


Figure 32. Principe du « Protoarray™ » .
Les protéines déposées sur la lame (cercles ouverts bleus) s'hybrident avec la protéine d'intérêt (bleu clair) étiquetée avec l'épitope V5 (bleu foncé). Ce dernier est reconnu par un anticorps anti-V5 (vert) couplé à l'AlexaFluor®647 (rouge). Et la fluorescence correspondant à une hybridation est lue par un scanner.

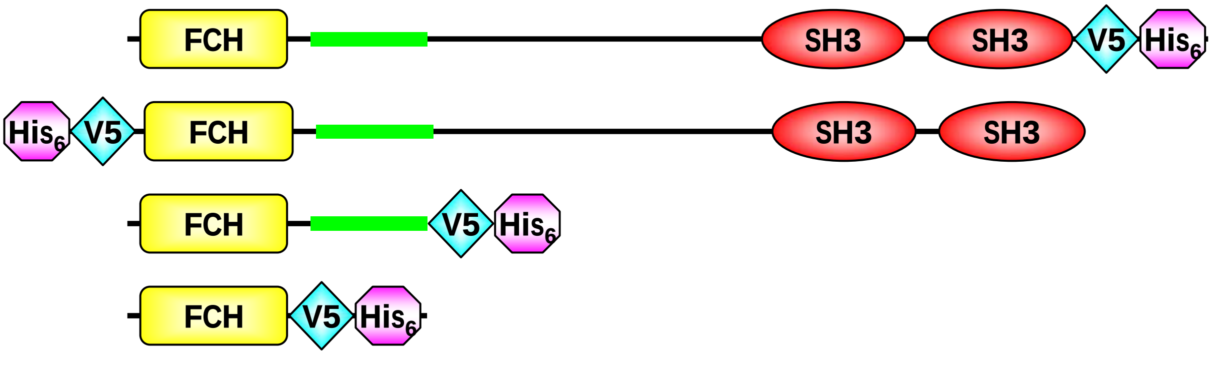


Figure 33. Constructions utilisées au cours de cette thèse. Les constructions avec les domaines SH3 ont été utilisées avec le « Protoarray™ », les autres avec les lipides sur membrane. FCH, Fes/Cip Homology ; SH3, Src Homology 3 ; V5, épitope V5 ; His6, étiquette de 6 Histidines. Les rectangles vert représentent le motif « coiled-coil ».

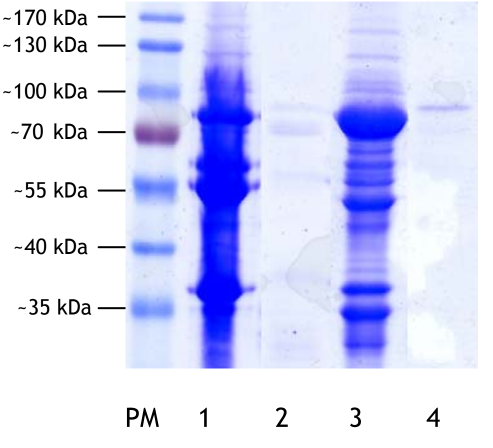


Figure 34. Purification de Bzz1p fusionnée en C- ou en N- terminal par l'étiquette V5-6xHis. Lignes, 1 : Extrait protéique de Bzz1p étiquetée en N-terminal, 2 : Bzz1p étiquetée en N-terminal purifiée, 3 : Extrait protéique de Bzz1p étiquetée en C-terminal, 4 : Bzz1p étiquetée en N-terminal purifiée.

protéine de la puce et Bzz1p sont ensuite révélées par la fixation de l'anticorps fluorescent anti-V5-AlexaFluor647 et lues sur un scanner de lame.

Nous avons construit la protéine Bzz1p étiquetée en C- et N- terminal (Figure 33) afin de comparer les résultats obtenus pour ces deux constructions. Les résultats obtenus peuvent être différents du fait de la position des domaines connus (SH3 et FCH) de Bzz1p aux extrémités de la protéine, c'est-à-dire que l'étiquette pourrait occasionner une gêne stérique. Pour éviter d'avoir des faux-négatifs, il est judicieux d'étiqueter une même protéine en C- et en N-terminal. Les constructions ont été réalisées avec l'utilisation de vecteurs permettant l'étiquetage avec des polyhistidines et l'épitope V5 : les plasmides pET101/D-TOPO et pET151/D-TOPO, permettant, respectivement, d'étiqueter une protéine d'interêt en C-terminal et en N-terminal produite dans *E. coli*. Dans ces plasmides, l'expression de la protéine de fusion est sous le contrôle du promoteur T7/*Lac* de la β-galactosidase, ce qui permet l'induction de la protéine chimère par ajout d'IPTG (isopropyl β-D-thiogalactopyranoside) dans le milieu de culture. Les fragments d'ADN correspondant au gène *BZZ1* ont été obtenus par PCR sur de l'ADN génomique provenant de la souche de levure BY4742 à l'aide des couples d'amorces OCO1/OCO2 et OCO1/OCO3 (cf tableau 13). Ils ont ensuite été insérés dans les plasmides pET101/D-TOPO ou pET151/D-TOPO (Figure 33). Après une mise au point des conditions d'expression, la protéine chimère a ensuite été purifiée à partir de la bactérie *E. coli* après une induction de l'expression de 4 h à 37°C avec 0,5 mM d'IPTG. La préparation de l'extrait protéique s'est faite par sonication. Bzz1p ne se retrouve pas dans la partie cellulaire soluble donc une étape de solubilisation était nécessaire avant sa purification sur billes d'agarose Ni-NTA. Une fois la protéine chimère purifiée (Figure 34), elle a été hybridée sur le «ProtoArray™».

Pour la poursuite de nos recherches nous avons choisis de sélectionner les protéines intéressantes sur les critères suivants : soit la protéine est connue par ailleurs pour faire partie de la machinerie de régulation du cytosquelette d'actine ou du trafic intracellulaire, soit la protéine cible est inconnue et pourra nous révéler un nouveau rôle.

B. Analyse de la liste des candidats potentiels obtenus.

Les protéines ayant interagit avec Bzz1p sont listées dans les tableaux 7, 8 et 9. Le Z-score correspond à l'intensité de fluorescence du point de dépôt de la protéine corrigée par le bruit de fond adjacent à ce point. 91 protéines ont été trouvées, seule Aip1p est connue pour avoir un rôle dans le cytosquelette d'actine. Bzz1p a été identifiée auparavant grâce à son interaction avec Las17p ; or celle-ci ne ressort pas de cette analyse car bien que présente sur la puce elle l'est en quantité très faible, ce qui peut fausser le traitement des données. De plus, un certain nombre de protéines du cytosquelette

Nom Sonde	Z-Score	Nom	Fonction	Localisation	Interaction
YJL167W	10,68	ERG20	Diméthylallyltransférase	Cytoplasme	
YDR267C	6,66	CIA1	Assemblage de protéines fer-soufre cytosoliques et nucléaires	Cytoplasme / noyau	
YKL213C	6,00	DOA1	Liaison de l'ubiquitine	Cytoplasme / noyau	
YDL045C	4,97	FAD1	FMN adénylytransférase	Cytoplasme	
YDR398W	4,58	UTP5	Liaison ARNsno	Nucléoles	
YBR056W	4,54			Cytoplasme	Yfr007W
YCR076C	4,13				Sec27, Pup3, Pre2, GCD7, Tem1, Srp1, Dcp2
YMR041C	4,07		Similaire aux Aldo/kéto réductases		
YCL043C	4,04	PDI1	Isomérase de protéine disulfure	Réticulum Endoplasmique (RE)	
YDL086W	4,03		Carboxyméthylènebutènolidase	Cytoplasme / Mitochondrie	
YHR074W	3,96	QNS1	Biosynthèse NAD	Cytoplasme / noyau	
YDR134C	3,81			Paroi cellulaire de chitine	
YDR428C	3,77				Yck3p, Prp19p, Srp1p, Pup1p
YBR088C	3,75	POL30	Facteur de processivité de l'ADN polymérase	Noyau	
YGR276C	3,65	RNH70	3'-5' exonucléase	Noyau	
YMR140W	3,53	SIP5	Interaction avec Reg1/Glc7 phosphatase and Snf1 kinase	Cytoplasme	
YGL210W	3,53	YPT32	GTPase (famille Rab)	Golgi / Endosome / membrane mitochondriale	Gdi1p, Yip3p, Prr1p, Sed5p, Tlg2p, Sec2p, Yif1p, Yip4p, Rcy1p
YBR121C	3,47	GRS1	Ligase glycine-ARNt	cytoplasme/ Mitochondrie	
YER101C	3,44	AST2	Adressage de [H+]ATPase à la membrane plasmique	Cytoplasme	Pcl1p
YMR268C	3,42	PRP24	Facteur d'épissage de l'ARN	snRNPU6	
YKL210W	3,42	UBA1	Enzyme activant l'ubiquitine	Cytoplasme / noyau	
YOL021C	3,35	DIS3	3'-5'-exonucléase	Mitochondrie	
YML053C	3,32			Cytoplasme / noyau	
YMR139W	3,31	RIM11	Glycogène synthase kinase 3	Cytoplasme	
YKR097W	3,30	PCK1	Phosphoénolpyruvate carboxykinase	Cytosol	
YDR008C	3,28				
YLL018C	3,28	DPS1	Liaison ARN	Cytosol	
YOL049W	3,22	GSH2	Glutathionne synthase	Intracellulaire	
YKL117W	3,21	SBA1	Liaison chaperon	Cytoplasme / noyau	
YER128W	3,20				Cmk1p, Vps4p
YEL047C	3,13		Fumarate réductase (NADH)	Cytosol/ Mitochondrie	
YBR053C	3,10				

Tableau 7. Partenaires potentiels de Bzz1p étiquetée en N-terminal obtenus avec le « Protoarray™ ». Seules les interactions des protéines choisies sont notées.

Nom Sonde	Z-Score	Nom	Fonction	Localisation	Interaction
YLR208W	13,80	SEC13	Molécule structurale	Cytoplasme	
YNL219C	10,01	ALG9	Mannosyltransférase	RE	
YIL091C	9,33		RNA hélicase	Noyau	
YOR209C	8,61	NPT1	Nicotinatephosphoribosyltransferase	Noyau	
YKR079C	7,54	TRZ1	Liaison des nucléotides puriques	Cytoplasme / noyau	
YGL062W	7,11	PYC1	pyruvate décarboxylase	Cytoplasme	
YER070W	6,25	RNR1	Ribonucléoside-biphosphate réductase	Cytoplasme	
YNL220W	5,87	ADE12	Adénylsuccinate synthase	Cytoplasme	
YHR112C	5,62		Cystathionine b-lycase	Cytoplasme	
YPR035W	5,41	GLN1	Glutamate-ammonia ligase	Cytoplasme	
YLR134W	5,27	PDC5	Pyruvate décarboxylase	Cytoplasme / noyau	
YML048W	5,06	GSF2	Repliement protéine	Membrane RE / cytoplasme	
YPR160W	4,76	GPH1	Glycogène phosphorylase	Cytoplasme	
YHR183W	4,71	GND1	Phosphogluconate déhydrogénase	Cytoplasme / Mi-tochondrie	
YLR069C	4,64	MEF1	Facteur d'élongation de la traduction	Mitochondrie	
YNL045W	4,32		Aminopeptidase	Cytoplasme / noyau	
YLR274W	4,09	CDC46	ATP-dépendent DNA hélicase	Noyau	
YER152C	4,02			Cytoplasme / noyau	
YJR096W	3,90		Aldéhyde réductase	Cytoplasme / noyau	
YMR120C	3,78	ADE17	Inosine monophosphate cyclohydrolase	Cytoplasme	
YGR256W	3,67	GND2	Phosphogluconate déhydrogénase	Cytoplasme	
YOL038W	3,66	PRE6	endopeptidase	Cytoplasme / Mi-tochondrie	
YJR039W	3,63			Mitochondrie	
YLR034C	3,60	SMF3	Transporteur des ions fer	Membrane va-cuolaire	
YNL009W	3,59	IDP3	Isocitrate déhydrogénase (NADP+)	Cytoplasme / Mi-tochondrie	
YLR460C	3,59				Prk1p, Pho80p, Mtl1p, Atp4p
YPL222W	3,48	FMP40		Mitochondrie	
YBL055C	3,40		3'-5'-exodeoxyribonucléase	Cytoplasme	
YKL211C	3,39	TRP3	anthranilate synthase	Cytoplasme	
YKR084C	3,31	HBS1	Traduction	Cytoplasme	
YGR026W	3,23				Pcl1P, Yck1p, Pex30p
YCR024C	3,15	SLM5	Asparagine-ARNt ligase	Mitochondrie	
YBR175W	3,05	SWD3	Histone lysine N-méthyltransférase	Noyau	
YNL280C	3,01	ERG24	d14-stérol réductase	RE	

Tableau 8. Partenaires potentiels de Bzz1p étiquetée en C-terminal obtenus avec le « Protoarray™ ». Seules les interactions des protéines choisies sont notées.

Nom Sonde	Z-Score Bzz1-Cter	Z-Score Bzz1-Nter	Nom	Fonction	Localisation	Interaction
YMR092C	11,22	10,87	AIP1	Dépolymérisation des filaments d'actine	Taches corticales d'actine	
YNR033W	6,71	13,22	ABZ1	4-amino-4-déoxychorismate synthase	Cytoplasme	
YGR200C	8,32	9,84	ELP2	RNA polymérase II Elongator subunit	Cytoplasme / noyau	
YGL213C	7,49	4,24	SKI8	Répresseur traduction	Cytoplasme / noyau	
YMR099C	3,36	7,87		Glucose-6-phosphate 1-épimérase	Cytoplasme / noyau	
YPL281C	3,46	3,63	ERR2	Phosphopyruvate hydratase		
YNL117W	4,83	3,24	MLS1	Malate synthase	Cytoplasme / Peroxysome	
YDR432W	4,09	3,63	NPL3	Liaison ARNm	Cytoplasme / noyau	
YLR027C	5,11	4,99	AAT2	Aspartate transaminase	Cytoplasme / Peroxysome	
YOL056W	5,15	5,03	GPM3		Cytoplasme	
YDR516C	14,04	7,06	EMI2	Induction méiose précoce	Cytoplasme	
YMR304W	3,75	3,43	UBP15	Protéase spécifique de l'ubiquitine	Cytoplasme	
YKR018C	3,24	4,35			Cytoplasme / noyau	Rsp5, YnR029, Pcl2, Pho80
YMR205C	7,06	3,97	PFK2	6-phospho fructokinase	Cytoplasme	
YLR258W	11,70	5,47	GSY2	glycogène synthase	Cytoplasme	
YBR222C	10,52	7,25	PCS60	Liaison AMP	Peroxysome	
YLL026W	3,16	3,30	HSP104	ATPase, liaison chaperon	Cytoplasme / noyau	
YGR287C	5,01	6,19		Hydrolase	Mitochondrie	
YER091C	4,97	6,49	MET6	Métabolisme méthionine	Cytoplasme	
YIL156W	17,05	3,64	UBP7	Protéase spécifique de l'ubiquitine	Cytoplasme	
YOR143C	7,06	5,72	THI80	Thiamine diphosphokinase	Cytoplasme	
YPR135W	3,56	5,30	CTF4	Liaison ADN	Noyau	
YGR292W	16,98	14,84	MAL12	Alpha-glucosidase		
YKR009C	6,67	3,27	FOX2	Beta-oxydation des acides gras	Peroxysome	
YBR299W	11,03	6,28	MAL32	Alpha-glucosidase		

Tableau 9. Partenaires potentiels obtenus sur deux lames du « Protoarray™ » avec Bzz1p étiquetée en N- et en C-terminal. Seules les interactions des protéines choisies sont notées.

d'actine n'a pas été déposé sur la puce (actine, Myo3p et Myo5p, Pan1p, Abp1p, Vrp1p, Rvs167p, Sla1p ou Bbc1p et parmi les protéines du complexe Arp2/3, seule Arp2p est présente). Les résultats obtenus vont peut être nous permettre d'identifier d'autres processus biologiques qui pourraient impliquer Bzz1p. Parmi les 113 interactants répertoriés dans SGD, nous en avons retrouvé seulement 2 avec le «ProtoArray™», Ubp7p, une protéase ubiquitine spécifique et Erg24p, une C-H stérol réductase. 25 protéines s'hybrident avec Bzz1p étiquetée à l'extrémité N-terminale et Bzz1p étiquetée à l'extrémité C-terminale. Il est à noter que quatre protéines trouvées sur les puces ont un lien avec l'ubiquitine, Ubp15p, Ubp7p, Uba1p et Doa1p.

Après analyse des résultats obtenus pour les deux étiquetages, j'ai choisi de travailler sur Aip1p et sur 6 protéines de fonction inconnue afin de chercher s'il y a un lien fonctionnel avec Bzz1p.

1) Aip1p

C'est une protéine de 615 acides aminés codée par le gène *YMR092c*. Aip1p interagit avec la cofiline et ensemble, elles régulent la dépolymérisation des filaments d'actine (Iida et Yahara, 1999; Rodal *et al.*, 1999). Aip1p régule le cytosquelette d'actine et est requise pour la localisation correcte des taches corticales d'actine chez *S. cerevisiae* (Rodal *et al.*, 1999). Aip1p (Actin-interacting protein 1) appartient à la famille de protéines contenant des répétitions WD ou répétitions WD40 (Voegtli *et al.*, 2003). Ces dernières sont des séquences homologues d'environ 40 acides aminés encadrés par la paire Gly-His à l'extrémité N-terminale et par la paire Trp-Asp à l'extrémité C-terminale (Pickles *et al.*, 2002). Ce candidat semble intéressant, car c'est celui qui s'est hybridé avec la plus forte interaction.

2) Ast2p

C'est une protéine de 430 acides aminés codée par le gène YER101C. Son rôle biologique n'a pas été décrit. Il semblerait cependant que Ast2p (ATPase stabilizing) pourrait jouer un rôle dans le ciblage de [H+]ATPase (Pma1p) à la membrane plasmique, comme suggéré par l'analyse des interactions génétiques (Saccharomyces Genome Database, http://www.yeastgenome.org/). Or Pma1p a été trouvé au laboratoire comme interagissant avec Bzz1p par le crible double hybride au laboratoire (travaux non publiés).

3) Ypt32p

C'est une protéine de 222 acides aminés codée par le gène *YGL210w*, une GTPase de la famille Ypt/Rab family, très similaire et redondant avec Ypt31p. Elle est impliquée dans la voie de l'exocytose; elle médie le trafic intra-Golgi ou le bourgeonnement des vésicules vers le post-Golgi à partir du trans-Golgi (Benli *et al.*, 1996; Jedd *et al.*, 1997; Lazar *et al.*, 1997; Wang et Ferro-Novick, 2002). Une GEF de Ypt32p est suggéré comme étant un effecteur de Ypt1p qui régule l'arrimage et la fusion de vésicules entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi, établissant ainsi une voie de signalisation dans l'exocytose (Wang et Ferro-Novick, 2002).

4) Protéines non caractérisées

Nom protéine	**Ykr018cp**	**Yer128wp**	**Ydr428cp**	**Ycr076cp**
Taille (en aa)	730	203	261	250
Interactants connus		Vps4p (Ptacek *et al.*, 2005), une ATPase requise pour un transport efficace des endosomes tardifs à la vacuole.	Srp1p (Ito *et al.*, 2001)	Srp1p (Ito *et al.*, 2001) Sec27p (Ho *et al.*, 2002)
Remarques	Fonction inconnue	protéine impliquée dans l'endocytose et le tri des vacuoles	Potentielle alpha/beta-serine hydrolase	Fonction inconnue

C. Etude phénotypique des souches dépourvues des gènes codants pour les candidats retenus

La recherche de la fonction d'un gène non caractérisé est un projet pouvant s'avérer long et hasardeux. Il est alors utile d'appréhender cette étape de façon systématique en utilisant des tests prédéfinis. La première étape d'une telle approche consiste généralement à déterminer les phénotypes résultants de la délétion du gène d'intérêt dans différentes conditions de croissance. Ces protéines de fonctions inconnues sont toutes codées par des gènes non-essentiels ce qui permet l'analyse directe des souches délétées pour chaque gène. Des défauts de croissance à différentes températures ou une sensibilité à différents produits ou des défauts morphologiques ou cytologiques, etc... peuvent nous aider à déterminer si un processus cellulaire connu est impliqué. Ainsi une meilleure caractérisation du gène d'intérêt est alors possible. Pour ces expériences,

	T (°C)	BY4742 (WT)	*bzz1Δ*	*ast2Δ*	*ykr018cΔ*	*yer128wΔ*	*ydr428cΔ*	*ycr076cΔ*	*ypt32Δ*
YPD	25	+	+	+	+	+	+	+	+
	30	+	+	+	+	+	+	+	+
	37	+	+	+	+	+	+	+	+
YPG + NaCl (1 M)	25	+	+	+	+	+	+	+	+
	30	+	+	+	+	+	+	+	+
	37	+	+	+	+	+	+	+	+
YPG + Sorbitol (1,8 M)	25	+	+	+	+	+	+	+	+
	30	+	+	+	+	+	+	+	+
	37	+	+	+	+	+	+	+	+
YPG + DMSO (0,1 %) Contrôle du bénomyl	25	+	+	+	+	+	+	+	+
	30	+	+	+	+	+	+	+	+
	37	+	+	+	+	+	+	+	+
YPG + Bénomyl (50 µM)	25	+	+	+	+	+	+	+	+
	30	+	+	+	+	+	+	+	+
	37	+	+	+	+	+	+	+	+
YPG + Calcofluor White (50 µM)	25	+	+	+	+	+	+	+	+
	30	+	+	+	+	+	+	+	+
	37	+	+	+	+	+	+	+	+
YP_Glycérol	25	+	+	+	+	+	+	+	+
	30	+	+	+	+	+	+	+	+
	37	+	+	+	+	+	+	+	+

Tableau 10. Analyse phénotypique des effets des délétions des différents candidats dans différentes conditions de croissance. + = croissance normale

nous avons utilisé les souches délétées provenant de la banque du projet de délétion du génome de Saccharomyces cerevisiae (http://www-sequence.stanford.edu/group/yeast_deletion_project/deletions3.html). Cette démarche par la génétique va de pair avec une confirmation de l'interaction des deux protéines *in vitro* et *in vivo*.

1) Croissance des mutants à différentes températures et sur différents milieux

a) Croissance à différentes températures

Nous avons recherché si les souches de levure dépourvues d'une des protéines candidates étaient plus sensibles à l'augmentation de la température de croissance. Pour cela les souches haploïdes de la banque de délétion ainsi que la souche sauvage ont été cultivées dans du milieu YPD une nuit à 25°C. Ensuite une même quantité de cellules sont déposées sous forme de goutte sur du milieu YPD ou SC que l'on incube à différentes températures de croissance (25, 30 et 37 °C). Les résultats, résumés dans le tableau 10, indiquent que les souches dépourvues des protéines candidates sont capables de croître aussi bien que les cellules sauvages à toutes les températures de croissance testées. Ainsi ces différentes délétions n'entrainent aucune thermo-sensibilité sur milieu classique de croissance.

b) Croissance sur milieux hyper-osmotiques

La sensibilité d'un mutant à une forte osmolarité extracellulaire est souvent le signe d'un défaut de synthèse ou d'organisation de la paroi cellulaire élément essentiel à la préservation de l'intégrité osmotique de la cellule. Ce phénotype est souvent associé à des mutations ou délétions de gènes impliquées dans la voie de signalisation HOG (High Osmolarity Growth) (pour revue : (Saito et Tatebayashi, 2004)) ou dans l'organisation du cytosquelette d'actine. Ainsi, nous avons voulu déterminer si des conditions d'hyper-osmolarité pouvaient engendrer des défauts de croissance des différents mutants. Des tests en goutte ont donc été réalisés sur milieu YPD et SC contenant de fortes concentrations en chlorure de sodium (1 M) ou sorbitol (1,8 M), deux agents osmotiques importants. Ces essais ont été réalisés à différentes températures (25, 30 et 37°C) afin de visualiser une éventuelle synergie d'effet entre l'osmolarité et la température de croissance sur les mutants. Dans les conditions testées, aucune osmo-sensibilité n'a été détectée chez les mutants quelle que soit la température de croissance (Tableau 10).

Parallèlement, la croissance des mutants haploïdes a été testée sur YPD ou SC contenant du Calcofluor White (CW 50 µM). Cette drogue est capable d'altérer la paroi

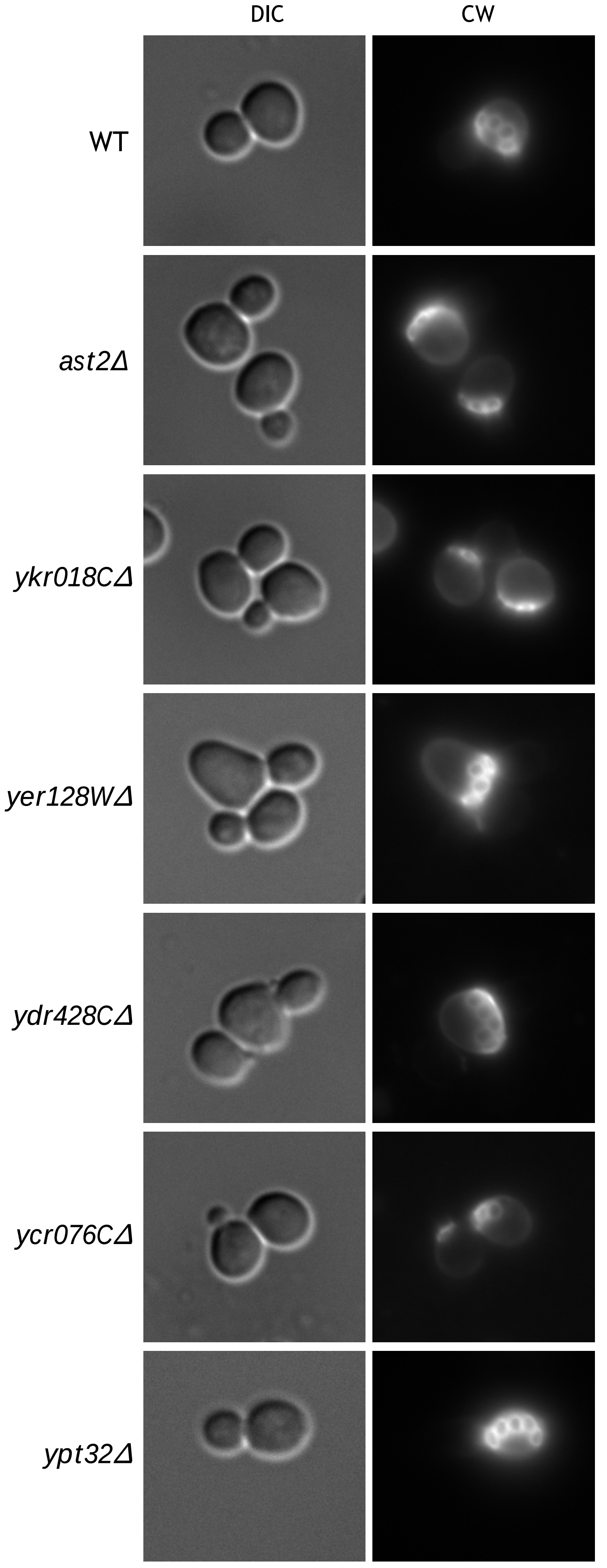


Figure 35. Effets des différentes délétions sur le profil de bourgeonnement dans des souches haploïdes. Les cicatrices de chitine sont marquées avec du Calcofluor White (CW). La souche sauvage est BY4742.

cellulaire de la levure et sa présence peut amplifier des défauts de paroi préexistants chez certains mutants. Dans toutes les conditions de température testée, la présence de Calcofluor White n'affecte pas la croissance des différents mutants examinés (Tableau 10).

c) Croissance sur une source carbonée non fermentable

La croissance des différentes souches mutantes n'est pas ralentie sur un milieu contenant une source de carbone fermentable telle que le glucose (ou dextrose). Nous avons testé si ces différentes souches mutantes étaient capables de métaboliser correctement une source de carbone non fermentable telle que le glycérol. Une déficience de croissance sur un milieu contenant du glycérol est souvent le premier indice d'un déficit dans le processus de la respiration cellulaire. Ainsi la capacité des différentes souches mutantes à croître sur du YP-Glycérol a été analysée par des tests en goutte à 25, 30 et 37°C. Comme le montre le tableau 10, les différentes délétions n'altèrent pas la capacité des cellules à se diviser en présence de glycérol comme seule source de carbone.

d) Croissance en présence de bénomyl

Nous avons réalisé le même type de tests en goutte avec les différentes souches mutantes et sauvage sur un milieu contenant 50 µM de bénomyl, un agent dépolymérisateur des microtubules. La dépolymarisation des microtubules peut conduire à des défauts de la division cellulaire. Le test réalisé à 25, 30 et 37°C montre que la croissance d'aucune des souches mutantes n'est affectée par la présence de bénomyl (Tableau 10).

2) Recherche d'un effet des différentes délétions surle profil de bourgeonnement, le cytosquelette d'actine et l'endocytose en phase fluide.

a) Profil de bourgeonnement

Chez *S. cerevisiae*, l'émergence du bourgeon est un processus hautement polarisé. La sélection du site de bourgeonnement a lieu à différents sites cellulaires en fonction de la ploïdie. Chez les cellules diploïdes l'émergence du bourgeon se fait successivement à chacun des de ses pôles (bourgeonnement bipolaire) alors que pour les cellules haploïdes le bourgeon apparaît près du site de bourgeonnement précédent (bourgeonnement axial) (Casamayor et Snyder, 2002; Chant et Herskowitz, 1991). Cette sélection du site de bourgeonnement (axial ou bipolaire) nécessite la mise en place des protéines Bud1p, Bud2p, Bud5p qui recrutent le cytosquelette d'actine qui assure l'acheminement des

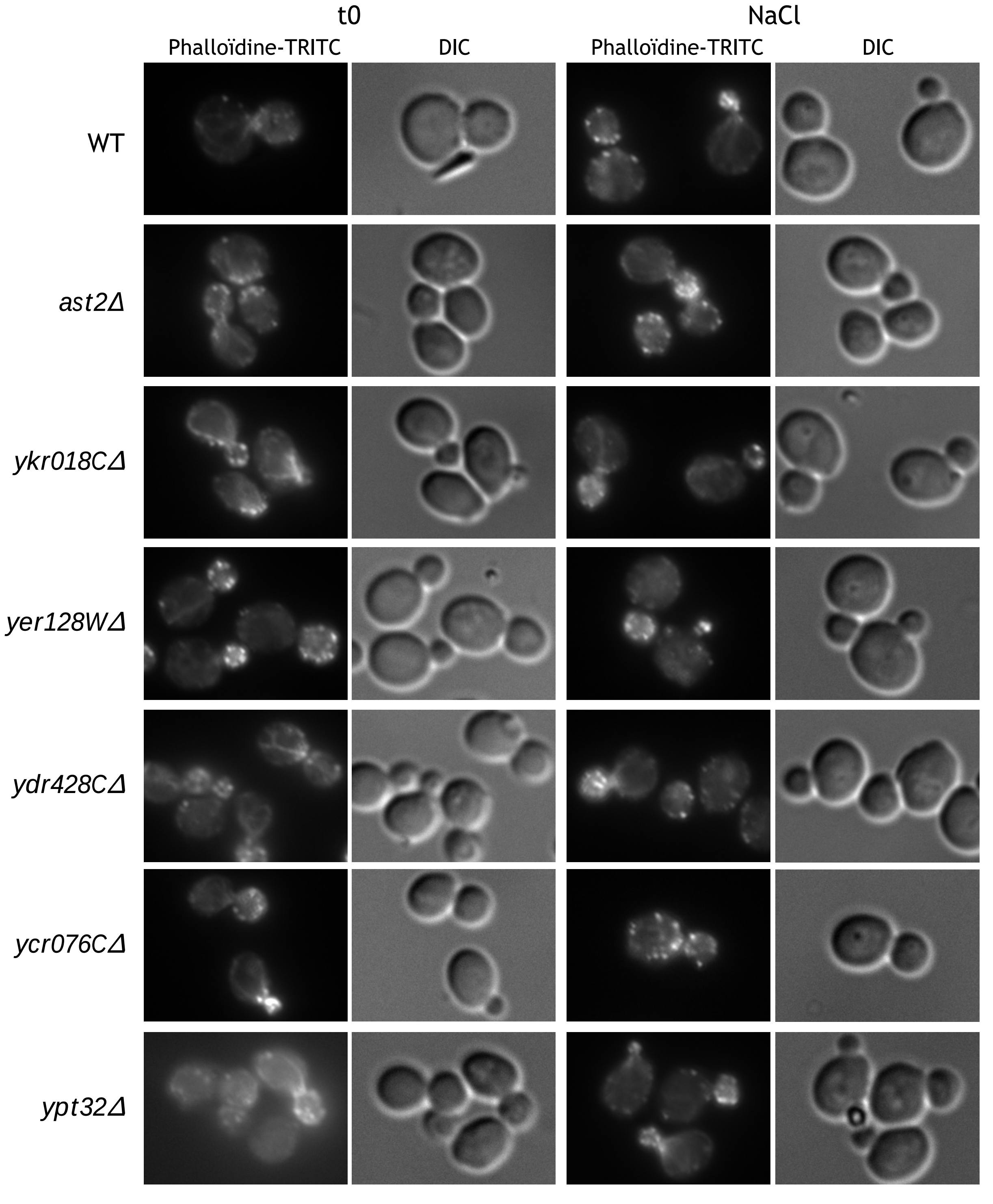


Figure 36. Effets des délétions des différents candidats sur l'organisation du cytosquelette d'actine et sur sa repolarisation après un stress salin (NaCl 1M). Les cellules sont cultivées à 25°C avant de subir le stress salin pendant 5 h et colorées avec de la phalloïdine-TRITC comme décrit dans Matériel et Méthodes. La souche sauvage est BY4742.

composants indispensables à la croissance du bourgeon (Cabib *et al.*, 1998). Chaque bourgeonnement laisse une cicatrice sur les cellules mère et fille. Cette cicatrice en forme d'anneau correspond à l'accumulation de chitine, un constituant de la couche interne de la paroi cellulaire qui est responsable de la forme et de la rigidité de cette dernière (Zlotnik *et al.*, 1984). Lorsque certaines protéines importantes pour la polarité, la sélection du site de bourgeonnement ou le cytosquelette d'actine sont absentes ou mutées, il peut en résulter une délocalisation totale de la chitine (diffuse ou agrégats), un bourgeonnement aléatoire, ou encore le passage d'un bourgeonnement axial à un bourgeonnement bipolaire dans les cellules haploïdes.

La détermination du profil de bourgeonnement est réalisée grâce à la détection de la chitine concentrée dans les cicatrices par la coloration au Calcofluor White. Nous avons donc coloré des cellules haploïdes sauvages et comportant la délétion des différents candidats retenus au Calcofluor. Comme le montre la figure 35, les cellules des différentes souches mutantes haploïdes bourgeonnent comme les cellules sauvages, de manière axiale à 25°C. De plus aucun défaut dans la répartition de la chitine n'est observé chez ces mutants. Ceci suggère que la sélection du site de bourgeonnement et la sécrétion polarisée des composants de la paroi cellulaire ne sont pas affectées par les différentes délétions.

b) Organisation du cytosquelette d'actine

Nous nous sommes également intéressés à l'organisation du cytosquelette d'actine dans les souches mutantes. L'actine polymérisée existe sous trois formes chez la levure de boulanger : les câbles d'actine, les taches corticales d'actine situées sous la membrane plasmique et un anneau d'actomyosine situé à l'étranglement entre la cellule mère et la cellule fille lors de la cytocinèse. Ainsi, les cellules sauvages ou mutantes sont cultivées une nuit à 25°C puis fixées et colorées avec de la phalloïdine (une drogue se fixant spécifiquement à l'actine polymérisée) couplée à un fluorophore afin de visualiser les filaments d'actine. La figure 36 montre que le cytosquelette d'actine est correctement polarisé au cours du cycle cellulaire dans les souches mutantes. Les câbles sont orientés le long de l'axe de croissance cellulaire et les taches corticales d'actines sont capables de polariser au niveau du site d'émergence du bourgeon, dans les bourgeons en croissance et à l'étranglement entre la cellule mère et la cellule fille avant la cytocinèse.

Une délétion de *BZZ1* n'a pas de conséquence sur l'organisation du cytosquelette d'actine mais une double délétion de *BZZ1* et *MYO5* (souche SLW571) affecte la repolarisation du cytosquelette d'actine après un choc osmotique (Soulard *et al.*, 2002). En effet, après un stress salin, le cytosquelette d'actine se dépolarise très rapidement et peut causer un retard de croissance des cellules de levure. Après 1 ou 2 h, *S. cerevisiae*

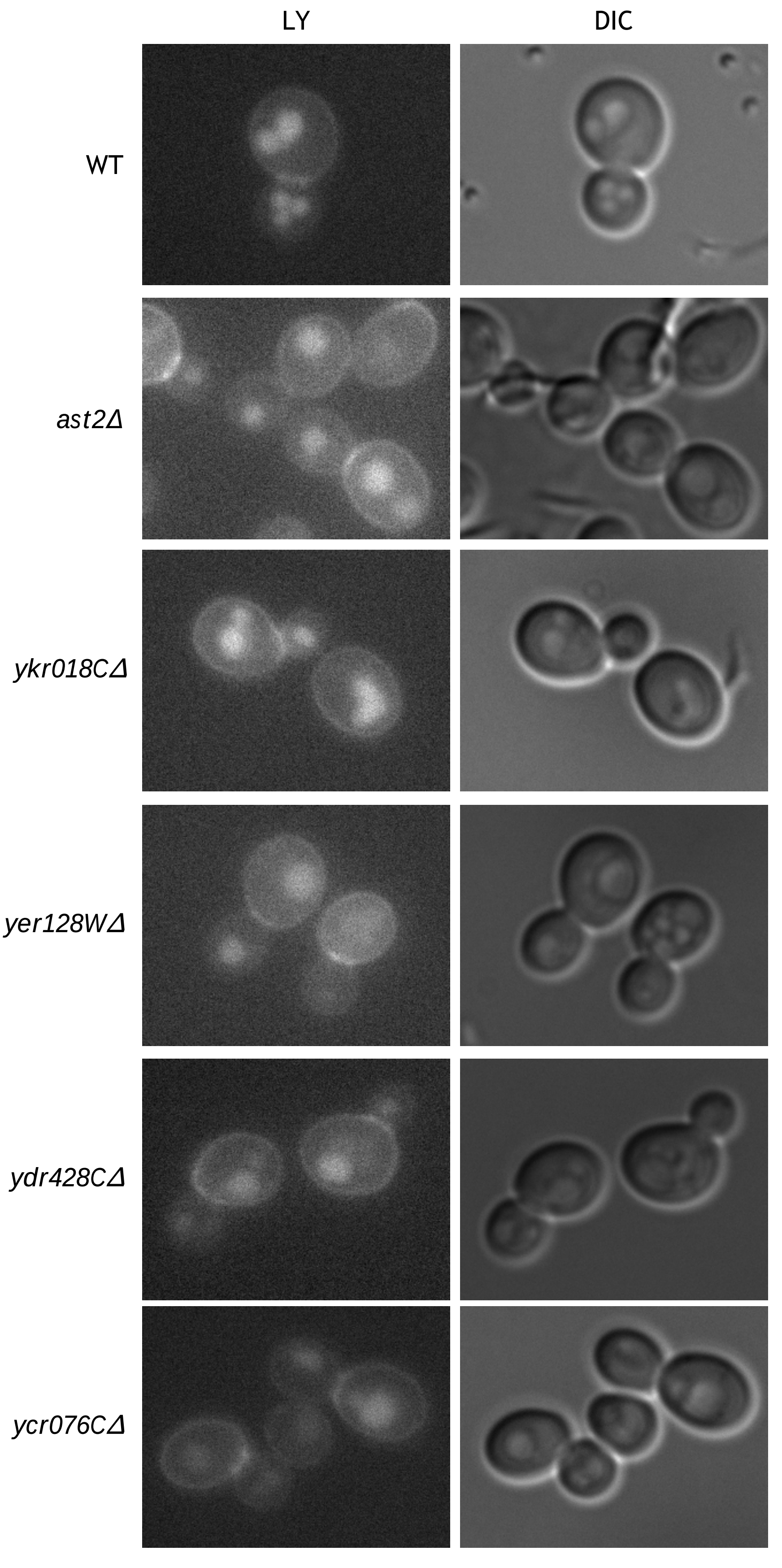


Figure 37. Analyse de l'endocytose en phase fluide par l'internalisation du « Lucifer Yellow » à 25°C dans les cellules sauvages BY4742 et mutées pour *bzz1Δ* et pour les différents candidats. La souche sauvage est BY4742.

s'adapte à la forte concentration en sel et son cytosquelette d'actine se repolarise progressivement et complètement (Chowdhury *et al.*, 1992). Nous avons voulu tester si les délétions des différents partenaires potentiels de Bzz1p avaient un effet sur la repolarisation du cytosquelette d'actine après un stress salin (Figure 36). La première constatation intéressante est que la souche BY4742 (souche sauvage de la banque de délétion) est complètement repolarisée après 5 h de stress salin (NaCl, 1 M) ce qui est relativement long. En effet, la souche SLW001 (construite par A. Soulard), qui est la souche sauvage de la souche SLW571 (*bzz1Δ myo5Δ*), le cytosquelette d'actine est repolarisé après seulement 3 h de stress salin. Parmi les différents mutants, le mutant *ycr076cΔ* montre un retard de repolarisation du cytosquelette d'actine lors d'un stress salin. En effet, après 5h de stress osmotique environ un tiers des cellules bourgeonnantes ne sont pas repolarisées. Ceci suggère que Ycr076Cp pourrait être impliquée dans la même voie de signalisation d'adaptation au stress salin que Bzz1p et Myo5p. Il faut utiliser d'autres méthodes pour confirmer ou infirmer cette hypothèse.

c) Observation de l'endocytose en phase fluide

L'endocytose est un processus biologique permettant aux cellules eucaryotes d'internaliser du matériel extracellulaire (nutriments, hormones, etc.) ainsi que certaines parties de leur propre membrane plasmique. Ceci leur permet d'incorporer tous les éléments essentiels à leur croissance mais également de recycler ou d'éliminer certaines protéines membranaires. Lors de l'endocytose il y a invagination de la membrane plasmique puis formation de vésicules qui sont acheminées vers la vacuole. Deux types d'endocytoses peuvent être distingués : l'endocytose en phase fluide ou l'internalisation des composants membranaires (bulk membrane endocytosis) et l'internalisation par l'intermédiaire de récepteurs membranaires ou autres transporteurs. De nombreux marqueurs ont été développés chez la levure pour étudier l'endocytose : un colorant neutre, le « Lucifer Yellow CH » pour suivre l'endocytose en phase fluide jusqu'au lumen vacuolaire (Dulic *et al.*, 1991), le colorant lipophile FM® 4-64 (Vida et Emr, 1995) pour suivre les endosomes jusqu'à la membrane de la vacuole ; la phéromone facteur alpha radioactif pour l'internalisation par l'intermédiaire de son récepteur, Ste2p (Dulic *et al.*, 1991), ou l'uracile radiomarqué pour suivre l'internalisation du transporteur membranaire, la perméase à uracile (Volland *et al.*, 1994).

L'utilisation de ces différents marqueurs a permis de mettre en évidence que de nombreux composants du cytosquelette d'actine jouaient un rôle dans l'endocytose. L'étape d'internalisation de l'endocytose nécessite au minimum une cinquantaine de protéines (pour revues : (Goode et Rodal, 2001; Winsor et Schiebel, 1997)), entre autres,

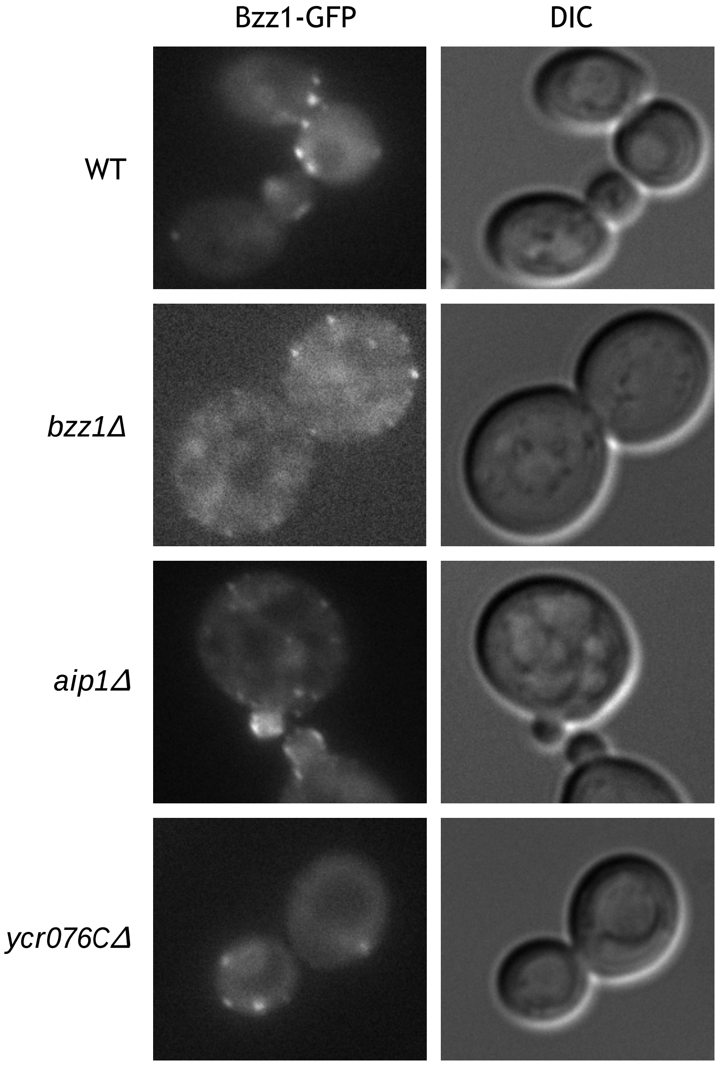


Figure 38. Localisation de Bzz1-GFP dans différentes souches mutantes et sauvage. La souche sauvage est BY4742.

l'actine (Kubler et Riezman, 1993), les composants du complexe Arp2/3 (Moreau *et al.*, 1997; Moreau *et al.*, 1996), Sla1p (Ayscough *et al.*, 1999) et Sla2p (Yang *et al.*, 1999), la verproline Vrp1p (Munn *et al.*, 1995), Myo5p une des myosines de type I (Geli et Riezman, 1996), Las17p (Li, 1997; Madania *et al.*, 1999) et Bzz1p (Soulard *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2006), les plus proches de notre intérêt actuel. Comme les différents candidats issus du « Protoarray™ » sont des partenaires potentiels de Bzz1p, ils pourraient être, eux aussi, impliqués dans l'endocytose.

Nous avons alors analysé l'endocytose en phase fluide dans les différentes souches mutantes en suivant l'internalisation du « Lucifer Yellow » (LY, cf Mat et Méth). La figure 37 montre que ces différentes délétions ne bloquent pas l'internalisation de ce colorant à 30°C. Le LY s'accumule autant dans la vacuole des cellules mutantes que dans les cellules sauvages.

3) *Localisation de Bzz1p-GFP*

Pour déterminer si l'interaction potentielle de Bzz1p avec ces nouvelles protéines affectent la localisation cellulaire de Bzz1-GFP dans les souches élétées pour le gène *YCR076C* et pour celui de *AIP1* (Figure 38). Le plasmide portant la construction Bzz1-GFP (construit par Alexandre Soulard) a été transformé dans les souches délétées et la souche sauvage. Ces différentes délétions n'altèrent pas la localisation de Bzz1-GFP par rapport à sa localisation dans la souche sauvage et dans une souche délétée du gène *BZZ1*. Ceci suggère que Aip1p et Ycr076Cp ne sont pas nécessaires pour que Bzz1p se localise correctement dans les taches corticales. L'étude de ces interactions sera poursuivie en utilisant des techniques de biochimie classique comme l'immunoprécipitation.

D. Recherche d'une interaction génétique entre Bzz1p et certains de ses partenaires cellulaires potentiels

Les souches délétées ont été croisées avec une souche *myo5Δ bzz1Δ* (SLW571, construite par Alexandre Soulard) (Soulard *et al.*, 2002) afin d'obtenir des souches *bzz1Δ myo5Δ* délétées du gène d'un des candidats ou *bzz1Δ* délétées du gène d'un des candidats. Après croisement, les asques ont été disséqués et les spores analysés par sélection sur des milieux de sélection adéquats et par PCR afin d'isoler les génotypes attendus. La PCR était nécessaire pour différencier les souches contenant *TRP1* provenant de la souche haploïde de la banque de délétion et *TRP1* utilisé pour sélectionner la délétion de *MYO5*.

Une fois sélectionnées, les spores ont été testées par un test en goutte sur un milieu contenant du NaCl (0,3 M, 0,6 M et 0,9 M) afin de déterminer si la troisième

Milieux	YPG			YPG + NaCl								
				0,3 M			0,6 M			0,9 M		
T (°C)	25	30	37	25	30	37	25	30	37	25	30	37
BY4742	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SLW571	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
ast2Δ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ast2Δ bzz1Δ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ast2Δ bzz1Δ myo5Δ	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
yer128CΔ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
yer128CΔ bzz1Δ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
yer128CΔ bzz1Δ myo5Δ	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
ydr428CΔ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ydr428CΔ bzz1Δ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ydr428CΔ bzz1Δ myo5Δ	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
ycr076CΔ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ycr076CΔ bzz1Δ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ycr076CΔ bzz1Δ myo5Δ	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
ypt32Δ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ypt32Δ bzz1Δ myo5Δ	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-

Tableau 11. Analyse des effets des délétions des différents candidats à différentes températures sous l'effet d'un stress salin. + = croissance normale, - = pas de croissance

		Domaine 1		Domaine 2	
Nom	**Fonction**	**Nombre de peptides**	**Séquence couverte**	**Nombre de peptides**	**Séquence couverte**
Nucléaire, fonction ADN/ARN					
NSR1	Nuclear localization sequence-binding protein	19	40%		
EGD1	Enhancer of Gal4p DNA-binding activity 1	4	38%		
EGD2	Enhancer of Gal4p DNA-binding activity 2	4	37%		
EBP2	Epstein-Barr nuclear antigen 1 binding protein 2	3	8%		
nug1	Nucleolar GTPase 1	3	8%		
Cytosquelette					
BBC1	Myosin tail region-interacting protein MTI1	23	28%	34	41%
MYO5		17	22%	22	26%
YIR003W	Protéine qui interagit avec Abp1p via son domaine SH3			16	30%
ABP1		11	31%		
VRP1		8	19%	6	12%
LAS17		6	13%	2	4%
CMD1	calmodulin			4	38%
YBR108W	Interagit avec Rvs167p	3	4%	3	4%
YTM1	Protéine associée aux microtubules	2	5%		
Paroi cellulaire					
SVL3	protéine membranaire probable			4	8%
Transduction du signal					
DIG1	MAP kinase-associated protein			4	13%
INP53	Inositol polyphosphate 5-phosphatase 53			4	4%
Trafic Membranaire					
CDC68	cell division control protein CDC68	43	45%		
SEC21	Secretory 21, coatomer (COPI) complex gamma chain	19	28%		
SEC26	coatomer complex beta chain	17	21%		
SEC31 WEB1	Component (p150) of the COPII coat of secretory pathway vesicles			11	13%
SEC27	coatomer complex beta' chain	10	17%		
RET2	Coatomer (COPI) complex delta chain	5	15%		
RET1	coatomer complex alpha chain RET1	5	6%		
SRP72	signal recognition particle protein SRP72	4	7%		
SRP68	signal recognition particle protein SRP68	3	6%		
SEC23	protein transport protein SEC23	3	4%		
SEC28	Coatomer (COPI) complex epsilon chain	2	8%		
Autres/ Inconnus					
POB3	Component of the CP/yeast FACT complex	19	43%		
BFR1	Protein that suppresses brefeldin A-induced lethality	9	28%		
ZUO1	zuotin	7	26%		
SIK1	Nucleolar protein component of box C/D snoRNPs	7	17%		
arx1	Protein of unknown function	5	11%		
NAP1	nucleosome assembly protein I	4	13%		
KRE35	Large-subunit GTPase 1	4	9%		
HCR1	High copy suppressor of Rpg1	3	15%		
svf1	Survival factor 1	3	13%		
YGL242c	Protein containing two ankyrin repeats	2	18%	2	22%
RHR2	RHR2 protein			2	9%

Tableau 12. Protéines interagissant avec les domaines SH3 de Bzz1p après « GST-pulldown » et analyse par spectrométrie de masse.

délétion affectait le retard de croissance observé avec la souche *myo5Δ bzz1Δ* (Tableau 11). Nous n'avons pu observer aucun changement de croissance et ce pour aucune des souches portant une triple délétion par comparaison avec la souche portant la double délétion *myo5Δ bzz1Δ*. Il semble qu'aucune de ces délétions n'augmente les défauts testés de la souche *myo5Δ bzz1Δ*.

IV. Interactions domaine-spécifique de Bzz1p

En collaboration avec G. Ren, doctorant du laboratoire et A. Shevchenko (Max Plank, Dresde), nous avons pu analyser les interactions protéine-protéines spécifiques aux domaines SH3 de Bzz1p. Chaque domaine SH3 de Bzz1p a été fusionné à une étiquette GST (plasmides fournis par G. Cesarini), ces deux constructions ont été produites dans *E. coli* puis purifiées sur des billes GSH-Sépharose. Après incubation avec un extrait de levure sauvage (FY1679), les protéines fixées sur billes ont été séparées sur SDS-PAGE et analysées par spectroscopie de masse (MALDI-TOF). Les protéines obtenues par cette analyse sont répertoriées dans le tableau 12. Les deux domaines SH3 de Bzz1p interagissent avec des protéines du cytosquelette d'actine et parmi ces composants des protéines à domaine SH3 comme Bbc1p, Myo5p, Abp1p. De plus Las17p est retrouvée ainsi que Vrp1p et Yir003Wp qui interagit avec Abp1p et Ybr108Wp qui est un partenaire de Rvs167p. De nombreuses protéines impliquées dans le trafic membranaire semblent interagir avec les domaines SH3 de Bzz1p comme les Sec21/23/26/27/28/31p. Il est à noter que les protéines nucléaires retrouvées sont probablement des artefacts dû au fait que dans un extrait protéique on retrouve des protéines de tous les compartiments ce qui n'est pas le cas *in vivo*.

V. Interactions protéine - lipides de Bzz1p

A. Rôle du domaine F-BAR

Comme décrit précédemment, Bzz1p, un homologue de Toca-1 humaine, se compose de plusieurs domaines protéiques : un domaine F-BAR (FCH et coiled-coil) et deux domaines SH3. Récemment, il a été montré que certaines protéines de mammifères contenant un domaine BAR (Bin–Amphiphysin–Rvs) ou F-BAR et un (ou des) domaine(s) SH3 se lient aux phospholipides, notamment le phosphatidylsérine et le $PI(4,5)P_2$, de la membrane plasmique par leur domaine BAR/F-BAR et régulent le cytosquelette d'actine par leur(s) domaine(s) SH3 (Itoh *et al.*, 2005; Tsujita *et al.*, 2006). Nous avons voulu déterminer si le domaine F-BAR de Bzz1p était capable de lier des lipides et si oui lesquels. Pour cette recherche d'interactions entre Bzz1p et les lipides de la membrane plasmique, nous avons

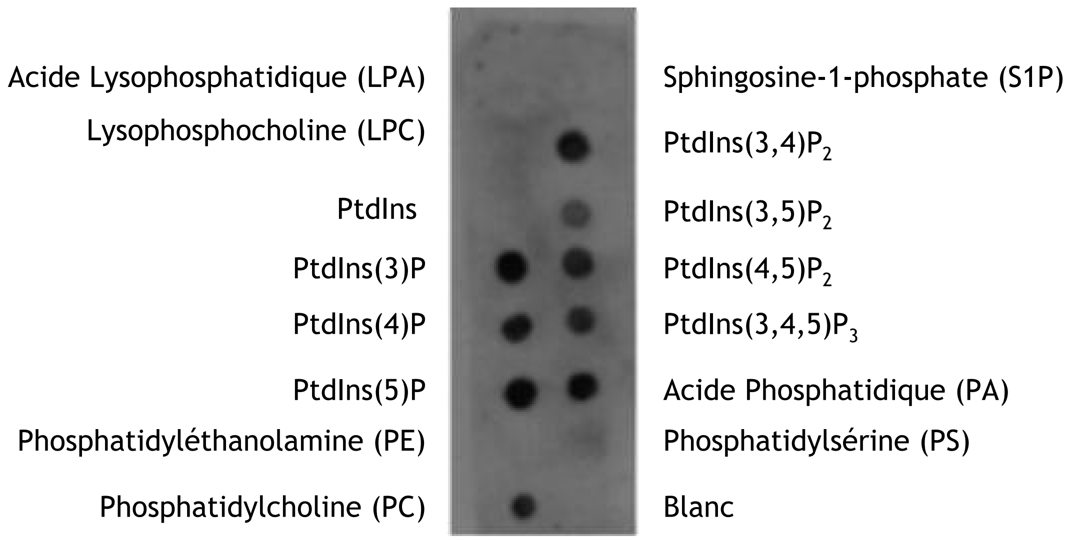


Figure 39. Interaction du domaine FCH de Bzz1p étiquetée en N-terminal (6His-V5) avec des phospholipides immobilisés sur membrane de nitrocellulose à 100 pmoles par point (PIP Strip, Echelon Bioscience).

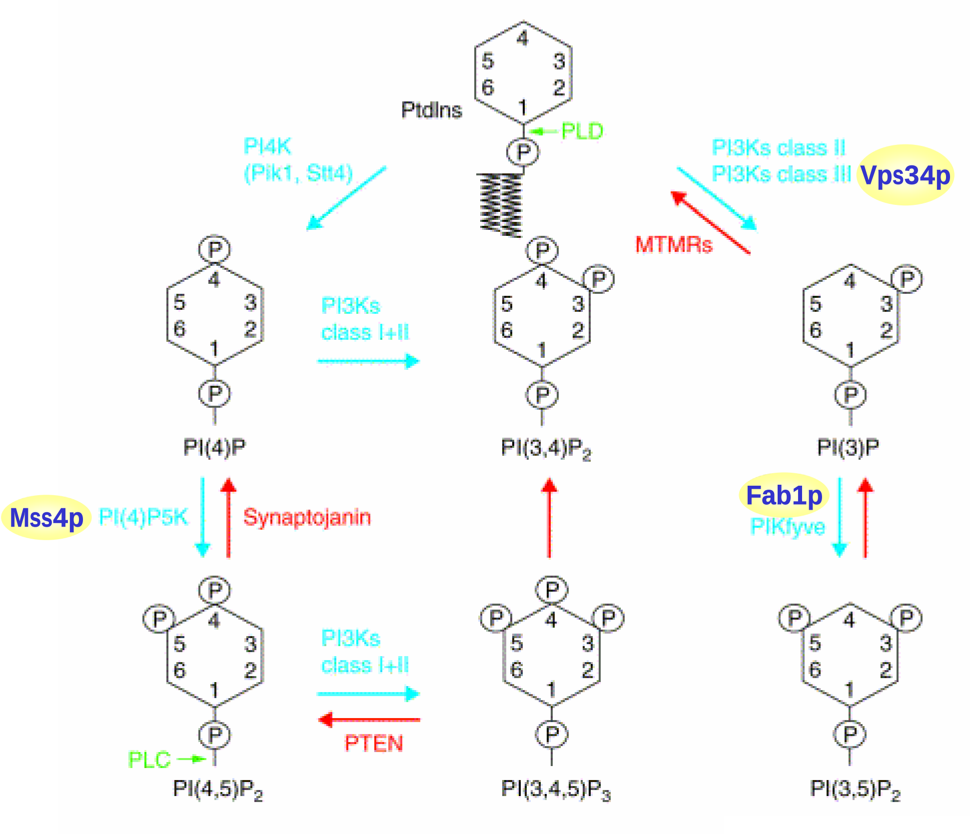


Figure 40. Métabolisme des phosphoinositides.
Adaptée de Simonsen *et al*, 2001.

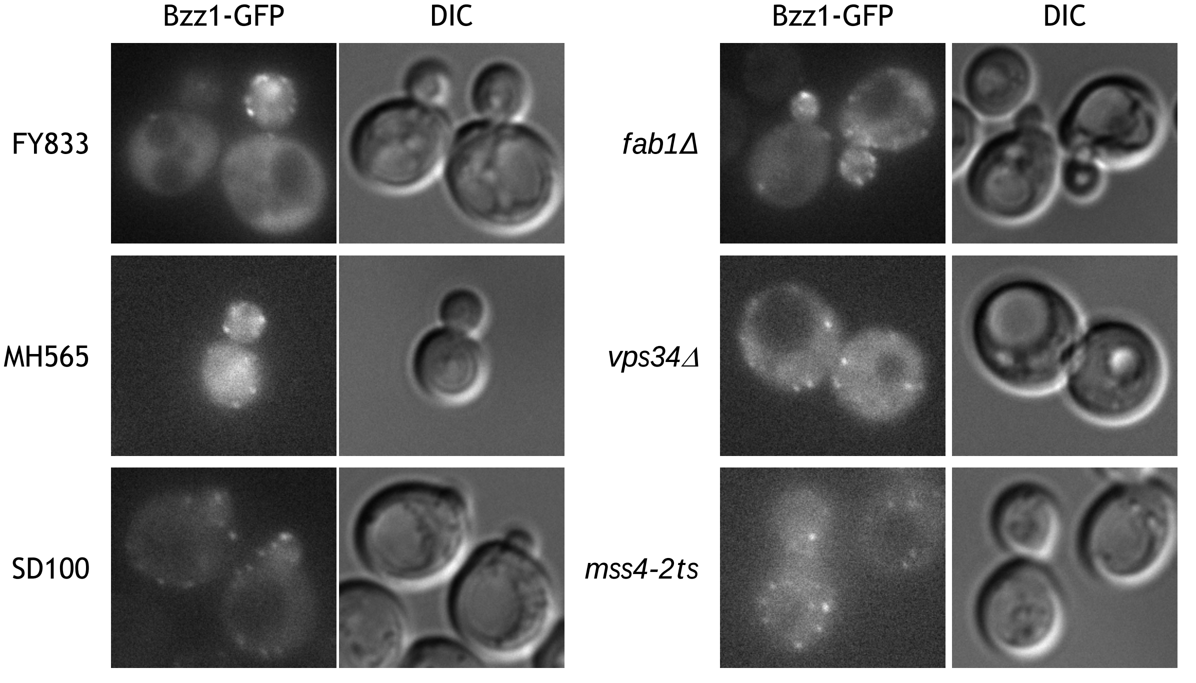


Figure 41. Localisation de Bzz1-GFP dans des souches défectueuses dans le métabolisme de certains phosphoinositides. Les souches FY833, MH565 et SD100 sont les souches sauvages contrôles respectives des souches *fab1Δ*, *vps34Δ* et *mss4-2ts*.

utilisé une membrane de nitrocellulose où ont été déposés plusieurs lipides, en particulier les phosphoinositides (PIP strip, Echelon Bioscience). La protéine d'intérêt étiquetée s'hybride avec ces partenaires lipidiques pendant une incubation d'une heure à 4°C puis l'interaction est révélée par l'utilisation d'un anticorps couplé à la peroxydase qui peut alors réagir avec le luminol. En pratique, nous avons construit le domaine FCH (les 110 premiers acides aminés de Bzz1p) et le domaine F-BAR, c'est-à-dire le domaine FCH plus le coiled-coil (les 210 premiers acides aminés de Bzz1p) fusionnés en C-terminal avec une étiquette protéique de six histidines ainsi que l'épitope V5. Le domaine FCH étiqueté en N-terminal est produit en relative abondance et a ainsi pu être purifié comme précédemment expliquées (cf section I.A.). En revanche, nous n'avons pas pu produire notre construction du domaine F-BAR malgré de nombreuses conditions testées.

Nos résultats montrent dans la figure 39, que le domaine FCH de Bzz1p est capable de se lier à l'acide phosphatidique, la phosphatidylcholine et tous les phosphatidylinositols phosphorylés. Il est d'ailleurs intéressant de noter que le domaine FCH de Bzz1p ne se lie pas au phosphatidylinositol non phosphorylé. Ceci indique que la présence d'au moins un phosphate est essentielle pour la liaison du domaine FCH à un lipide.

B. Localisation de Bzz1-GFP et les phosphoinositides

Pour étudier de plus près l'interaction du domaine FCH de Bzz1p avec les phospholipides, nous avons alors observé la localisation de Bzz1-GFP (Soulard *et al.*, 2002) dans des souches affectées dans la formation des phosphoinositides, c'est-à-dire des souches où une kinase permettant la phosphorylation d'un des phosphoinositides manque.

Au laboratoire, nous disposons de souches dont les kinases Mss4p, Fab1p et Vps34p sont inactives. Le mutant *mss4Δ* n'est pas capable de convertir le PI(4)P en PI(4,5)P_2, la souche *fab1Δ* est déficiente en PI(3,5)P_2 et la souche vps34Δ ne peut pas phosphoryler le phosphatidylinositol en PI(3)P (Figure 40).

Dans ces trois souches mutantes, Bzz1-GFP est localisée dans des taches corticales et il n'y a pas de différence notable vis-à-vis des souches sauvages correspondantes (Figure 41). Ceci signifie que le PI(4,5)P_2, le PI(3,5)P_2 et le PI(3)P ne sont pas nécessaires à la localisation correcte de Bzz1p au cortex cellulaire. Il serait souhaitable de tester la localisation de Bzz1-GFP dans d'autres souches portant des mutations pour d'autres kinases impliquées dans la synthèse des phophoinositol phosphates comme une souche déficiente en PI3Ks, en Pik1p ou Stt4p.

Chapitre 3.

Discussion et perspectives

Chapitre 3. Discussion et perspectives sur Bzz1p.

Dans ce travail, nous voulions confirmer lesquels des nombreux partenaires potentiels retrouvés dans les grands cribles représentaient des interactions directes et identifier de nouveaux partenaires de Bzz1p afin de préciser son rôle dans le cytosquelette d'actine et/ou dans le trafic intracellulaire.

I. Crible de surproduction

Pour la recherche de nouvelles interactions cibles de Bzz1p, nous nous sommes basés sur le fait que sa surexpression peut causer un retard de croissance voire une mort cellulaire à 37°C (Soulard *et al.*, 2002). Un crible de surproduction d'une banque d'ADN génomique associée à une surproduction de Bzz1p ne nous a pas permis d'isoler de candidats qui compensaient les effets toxiques de la surproduction de Bzz1p. Ceci peut être du à des critères pas suffisamment sélectifs ou à la difficulté d'analyse du crible. Il pourrait être intéressant de refaire ce crible en améliorant les critères de sélection et surtout en augmentant la température (40°C) ou en mettant en place la surproduction de Bzz1p avant de faire la sélection pour les plasmides qui compensent le phénomène de toxicité. On pourrait aussi changer le gène codant pour la résistance à l'ampicilline par un gène codant pour un autre antibiotique dans le plasmide p424-GAL1-BZZ1 afin de diminuer et de faciliter les étapes de récupération des plasmides de la banque et d'analyse. Il se pourrait aussi que cet effet soit dû à l'effet de plus d'une autre protéine cible, dans ce cas, une réponse du crible serait beaucoup plus difficile.

II. Interactions protéine-protéines

Par la suite, j'ai aussi lancé un crible par la technique du « Protoarray™ » afin de découvrir de nouveaux interactants protéine-protéine directs de Bzz1p. Comme toute technique, celle-ci a des avantages et des inconvénients. Son premier avantage est la rapidité du test. En effet, une fois la protéine étiquetée produite et purifiée, l'hybridation de la protéine étiquetée sur la puce contenant le protéome et la lecture des résultats prend une journée. Son plus grand avantage est certainement qu'un grand nombre de protéines sont ainsi testées. Elle a deux inconvénients majeurs. Premièrement, toutes les protéines du protéome de levure n'ont pas été déposées, en particulier un grand nombre de protéines du cytosquelette d'actine sont absentes et parmi les protéines du complexe Arp2/3, seule Arp2p est présente. De plus, certaines protéines sont présentes mais en concentration très faible comme Las17p déposée à environ 3 nM alors que certaines

protéines ont une concentration supérieure à 1 µM sur la puce. Il est possible que le fait que toutes les protéines ne soient pas déposées avec la même concentration puisse induire des faux positifs ou au contraire des faux négatifs. Ainsi selon la protéine que l'on souhaite étudier comme Bzz1p, un certain nombre d'informations intéressantes peuvent être perdues. Cependant, dans le cas de Bzz1p nous recherchions des interactions avec des protéines de fonction inconnue. Deuxième inconvénient, cette technique peut permettre de révéler des interactions protéine-protéine qui ne peuvent pas avoir lieu *in vivo* si les protéines ne sont pas dans les mêmes compartiments cellulaires. Par conséquent, cette méthode est utile lorsqu'on ne sait pas quelle est la fonction d'une protéine et que l'on cherche des interactions directes. Toutefois il est nécessaire de rechercher les interactions potentielles d'une protéine par d'autres méthodes tel le double hybride ou un crible sur fonction.

Dans le cas de Bzz1p, nous disposions déjà de résultats issus d'un crible double-hybride (thèse d'Alexandre Soulard) et nous recherchions d'autres partenaires potentiels pour Bzz1p. Il s'est avéré que tous les partenaires double-hybride trouvés pour Bzz1p (Myo5p, Las17p, App1p, Ldb17p, Mec1p, Pma1p, Ubp7p, Ypl277Cp et Yor389Wp) sont absents de la puce sauf Las17p qui, comme je l'ai déjà mentionné, est en quantité très faible. Il ne nous était donc pas possible de recouper ces résultats. Nous avons alors plutôt orienté nos recherches vers l'identification de protéines peu ou pas connues. Ce sont pour ces raisons que j'ai choisi de travailler avec les protéines Ykr018Cp, Yer128Wp, Ydr428Cp et Ycr076Cp dont la fonction est inconnue. De plus, j'ai choisi de travailler avec Ast2p qui pourrait jouer un rôle avec Pma1p, protéine trouvée dans le crible double-hybride, avec Ypt32p qui est impliquée dans l'exocytose et avec Aip1p qui intervient dans la régulation du cytosquelette d'actine (Rodal *et al.*, 1999). Aucune de ces protéines n'est essentielle car leur seule délétion n'entraine ni létalité, ni même de défaut de croissance, de thermosensibilité, de défauts de bourgeonnement, d'osmosensibilité ou de défaut de la paroi cellulaire (cf tableau 10 et figure 34). Des observations cytologiques dans les différents mutants ont permis de mettre en évidence que ces mutations n'affectaient pas le profil de bourgeonnement au cours du cycle cellulaire. L'organisation du cytosquelette d'actine et l'endocytose en phase fluide ne sont pas non plus perturbées par les différentes délétions simples (cf figures 35 et 36).

Les cellules *bzz1Δ myo5Δ* sont sensibles à une forte concentration de sel (1 M) et présentent un retard de croissance à 25°C voire une mort cellulaire à 37°C (Soulard *et al.*, 2002) ; nous avons donc testé l'effet d'un stress salin sur les cellules ayant des délétions simples des gènes codants pour les partenaires obtenus avec le « Protoarray™ ». Le stress salin est connu pour provoquer un délai de croissance au cours duquel le cytosquelette

d'actine est rapidement dépolarisé (Chowdhury *et al.*, 1992). Après une ou deux heures, les cellules s'adaptent au milieu et repolarisent progressivement et totalement leur cytosquelette d'actine. Dans les cellules sauvages de la souche BY4742, le temps nécessaire pour l'adaptation et le retour à une polarisation du cytosquelette d'actine est de quatre ou cinq heures pour avoir une récupération totale. Dans ces conditions, le cytosquelette d'actine est repolarisé dans seulement deux tiers des cellules de la souche *ycr076CΔ*. Ainsi, la repolarisation du cytosquelette d'actine après un stress salin serait affectée dans la souche mutante *ycr076CΔ*.

Nous avons souhaité tester les interactions potentielles des protéines X retenues avec le « Protoarray™ » dans un système génétique ; ainsi nous avons testé si la délétion de *BZZ1* ou la double délétion de *BZZ1* et *MYO5* est synthétique létale avec les différents mutants des gènes codants pour les protéines X. Nous avons alors construits différentes souches contenant des triples délétions *bzz1Δ myo5 Δ X Δ* ou des doubles délétions *bzz1Δ X Δ* par croisement des parents *bzz1Δ myo5 Δ* (SLW571) et *X Δ* (provenant de la banque de délétions). Ces différentes délétions n'entrainent pas de létalité synthétique ni de thermosensibilité. De plus, la délétion du gène X dans les souches avec une double ou une triple délétion n'altère pas la sensibilité au NaCl observée pour la souche *bzz1Δ myo5 Δ* : ceci semble indiquer que les candidats retenus avec le « Protoarray™ » ne sont pas ou peu impliqués dans ce phénomène d'osmosensibilité. Ces résultats ne nous ont pas permis de vérifier que Bzz1p interagissaient avec les différentes protéines X.

Nous nous sommes engagés alors dans des expériences de biochimie pour confirmer ces interactions par des expériences d'interactions d'affinité de « GST-pulldown » ou de « His-pulldown ». Après fixation de Bzz1p étiquetée avec des polyhistidines ou de la GST sur des billes Ni-NTA-Agarose ou Glutathion-Sépharose respectivement, suivie d'une incubation avec un extrait de levure contenant la protéine X fusionnée avec la GFP, puis une révélation par Western blot, il est possible de confirmer l'interaction potentielle entre la protéine X et Bzz1p. Ces expériences sont en cours.

D'après les résultats obtenus avec le crible par la technique du « Protoarray™ », quatre protéines interagissant avec l'ubiquitine, Uba1p, Ubp15p, Ubp7p et Doa1p, ont été retrouvées. Il semblerait donc que Bzz1p puisse être ubiquitinée pour être internaliser ou dégrader spécifiquement, soit Bzz1p peut elle-même faire partie de la voie de signalisation menant à l'ubiquitination ou déubiquitination d'autres protéines (pour revue : Dupre *et al.*, 2004).

III. Spectrométrie de masse

En collaboration avec G. Ren et A. Shevchenko, nous avons réalisé des GST-pulldown et identifié les interactants par spectrométrie de masse. Les domaines SH3 de Bzz1p sont capables d'interagir avec de nombreuses protéines impliquées dans le trafic membranaire en particulier les complexes COPI (Ret1p, Ret2p, Sec 21p, Sec 26p, Sec27p et Sec 28p) et COPII (Sec23p et Sec31p). Le complexe COPI est associé aux vésicules assurant le transport rétrograde de protéines entre les compartiments golgiens et du Golgi vers le réticulum alors que le complexe COPII est impliqué dans le transport antérograde des protéines du réticulum vers le compartiment intermédiaire du Golgi. Or Bzz1p est principalement localisé dans les taches corticales d'actine à la membrane plasmique (Soulard *et al.*, 2002). Cela suggère soit que les interactions entre le premier domaine SH3 de Bzz1p et les complexes COPI et COPII ne seraient pas pertinentes *in vivo*, soit qu'une faible population de Bzz1p serait au niveau du Golgi. En effet, dans les cellules de mammifères, le cytosquelette d'actine est recruté au niveau des membranes du Golgi (Cao *et al.*, 2005).

Avec cette technique nous avons confirmé que les domaines SH3 de Bzz1p sont capables d'interagir avec des protéines du cytosquelette d'actine comme Las17p, Vrp1p, Abp1p, Myo5p et Bbc1p. Cette méthode permet de révéler des interactions protéine-protéine directe ou indirecte c'est-à-dire avec une ou plusieurs protéines comme intermédiaires au sein d'un complexe protéique. En effet, Las17p, Vrp1p et Myo5p font partie du complexe protéique Las17/Vrp1/Myo3/5 et Bzz1p est un activateur de Las17p (Sun *et al.*, 2006). La protéine Yir003Wp semble interagir avec le deuxième domaine SH3 de Bzz1p. Yir003Wp interagit avec aussi avec Bbc1p (Tong *et al.*, 2002), Abp1p et Rvs167p (Landgraf *et al.*, 2004) ainsi qu'avec des protéines de coiffe des filaments d'actine Cap1/Cap2p (Collins *et al.*, 2007; Gavin *et al.*, 2006). Ybr108Wp, quant à elle, interagirait avec les deux domaines SH3 de Bzz1p. La protéine Ybr108Wp parait interagir avec Rvs161p et Rvs167p (Germann *et al.*, 2005; Krogan *et al.*, 2006) ainsi qu'avec la kinase Prk1p (Ptacek *et al.*, 2005), ainsi qu'avec des protéines liant Las17p : Lsb3p et Ysc84/Lsb4p (Landgraf *et al.*, 2004) et Lsb1p (Ito *et al.*, 2001). Si les interactions de Yir003Wp et Ybr108Wp se confirment avec Bzz1p entière, il serait envisageable de déterminer plus précisément le rôle de Bzz1p au sein des complexes protéiques régulant le cytosquelette d'actine.

Dans une approche de protéomique sur les domaines SH3 et leur rôle dans la régulation du cytosquelette d'actine, nous avons montré que certains domaines SH3 sont capables de lier Las17-GFP. Certaines de ses protéines étaient déjà connues comme

interagissant avec las17p : Bzz1p ou Myo5p (Soulard *et al.*, 2002) ou encore les Lsb1/2/3/4p (Madania *et al.*, 1999). Pour d'autres, une inhibition de Las17p était connue comme Bbc1p (Rodal *et al.*, 2003). Aucun des trois domaines SH3 de Sla1p indépendamment ne lie Las17p ; cependant (Rodal *et al.*, 2003) ont montré que lorsque les trois domaines SH3 de Sla1p sont réunis, ils inhibent Las17p. Afin de mieux comprendre le rôle des domaines SH3 dans la régulation de l'actine, il serait intéressant de faire des « GST-pulldowns » avec des extraits de levure dont d'autres protéines du cytosquelette d'actine soient fusionnées avec la GFP. Par la suite, il faut confirmer les résultats obtenus pour le domaine SH3 avec la protéine entière notamment quand la protéine possède plusieurs domaines SH3. Ces expériences sont en cours de développement au laboratoire.

IV. Interactions protéine-lipides

Nous avons pu mettre en évidence que le domaine FCH de Bzz1p est capable de se lier à des lipides et en particulier aux phosphatidylinositols phosphorylés et à l'acide phosphatidique et la phosphatidylcholine. Nous voulions tester ces interactions potentielles *in vivo* par l'observation de la localisation de Bzz1-GFP dans des souches déficientes d'une kinase conduisant à l'obtention de certains phosphoinositides. Aucun défaut de localisation n'a pu être observé dans des souches déficientes en Mss4p, Fab1p ou Vps34p. Il faut maintenant continuer ces observations avec des souches altérées pour d'autres kinases intervenant dans le métabolisme des phosphoinositides ou de la phosphatidylcholine ou de l'acide phosphatidique. Il sera intéressant de réaliser une construction du domaine F-BAR de Bzz1p qui puisse être produite, purifiée et hybridée sur une membrane de nitrocellulose où sont déposés des lipides ; ceci permettrait de déterminer s'il y a une spécificité pour un phosphoinositide donné. Cette même expérience avec la protéine Bzz1p entière pourrait nous renseigner si le domaine FCH/F-BAR de Bzz1p se lie de façon peu spécifique aux phosphoinositides phosphorylés ou au contraire possède une spécificité de liaison à seulement certains phosphoinositides phosphorylés. Par la suite, il faudrait produire une série de liposomes contenant différents phosphoinositides phosphorylés ou la phosphatidylsérine ou enfin l'acide phosphatidique afin d'étudier par microscopie électronique si les domaines FCH/F-BAR de Bzz1p ou la protéine entière sont capables de lier et déformer ou tubuler les membranes comme le font les homologues mammifères de Bzz1p (Itoh *et al.*, 2005; Tsujita *et al.*, 2006).

En conclusion, concernant les nouveaux rôles éventuels de Bzz1p, les indices les plus interessants que nous ayons obtenus proviennent des expériences faites sur des domaines isolés. Avec les GST-pulldowns sur les domaines SH3 de Bzz1p, nous avons

confirmé l'appartenance de Bzz1p au complexe protéique Las17p/Vrp1p/Myo3/5p et nous avons pu identifier deux nouvelles protéines Yir003Wp et Ybr108Wp qui pourraient relier Bzz1p à d'autres complexes du cytosquelette d'actine. De plus, nous avons montré que le domaine FCH de Bzz1p est capable de lier les phosphoinositides phosphorylés.

Donc Bzz1p serait un connecteur permettant l'accrochage des complexes activateurs de la polymérisation de l'actine aux membranes, en particulier la membrane plasmique et certainement d'autres sites.

Chapitre 4.

Matériels et méthodes

Chapitre 4. Matériels et Méthodes

Le manuel de biologie moléculaire de (Sambrook et Russel, 2001) a été utilisé comme guide pour la plupart des méthodes concernant la préparation de l'ADN plasmidique d'*E. coli*, le traitement de l'ADN par des enzymes de restriction et de modification et la séparation électrophorétique. La plupart des méthodes concernant la manipulation génétique de la levure a été effectuée selon (Guthrie et Fink, 1991).

I. Bactéries

A. Souches utilisées et génotypes

La bactérie *Escherichia coli* a été utilisée comme cellule hôte lors des clonages et lors de la production de protéines.

- **TOP10 :** F^- *mcr*A Δ(*mrr-hsd*RMS-*mcr*BC) Φ80*lac*ZΔM15 Δ*lac*X74 *rec*A1 *ara*D139 Δ(*ara-leu*)7697 *gal*U *gal*K *rps*L (Str^R) *end*A1 *nupG*. Cette souche a servi pour l'amplification de l'ADN plasmidique.
- **XL1-Blue** : recA *end*A1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 rel A1 lac[FproAB lacIq ZDM Tn10 (Tet^R)] Cette souche a servi pour l'amplification de l'ADN plasmidique.
- **BL21 Star™(DE3)** : F^- *ompT hsdS$_B$* ($r_B^- m_B^-$) *gal dcm rne131* (DE3). Cette souche a été utilisée pour induire la production de protéines en fusion avec des étiquettes 6xHistidines et V5 à partir du système de vecteurs pET/D-TOPO (Invitrogen).
- **MC1066 :** *F' D(lac)X74 hsdR hsdM rpsL galU galK trpC9830 leuB600 pyrF ::Tn5*. Cette souche a été utilisée pour sélectionner des plasmides portant les marqueurs d'auxotrophie URA3 de levure

B. Conditions et milieux de culture et conservation

La température optimale de croissance de la bactérie *Escherichia coli* est de 37°C. La culture se fait en milieu liquide ou sur milieu solide. De l'ampicilline (concentration finale 100 µg/mL) est ajoutée pour sélectionner les plasmides portant le gène Amp^R conférant la résistance à cet antibiotique.

Milieu LB (Luria Broth) : bactotryptone 1 %($^p/_v$) ; NaCl 1 %($^p/_v$) ; extrait de levure 0,5 %($^p/_v$)

Milieu M9 : Na_2HPO_4, $2H_2O$ 7,5 g/L, KH_2PO_4 3 g/L, NaCl 0,5 g/L, NH_4Cl 1 g/L. Après autoclavage ajout de 5 mL de glucose 40 %, 1 mL de vitamine B1 0,2 g/mL et 1 mL de $MgSO_4$ 1M.

Tous les milieux sont stérilisés par autoclavage à 120°C sous une pression de 1,2 bar pendant 20 min. Ils peuvent être solidifiés par l'addition de 2 % ($^{p}/_{v}$) d'agar.
Les cellules sont conservées dans du milieu glycérolé (15 %) à – 80°C.

C. Transformation et isolation de l'ADN Plasmidique

1) *Transformation*

a) Méthode chimique

10 mL de milieu LB sont inoculés à partir d'une colonie striée sur milieu solide de la souche que l'on désire rendre compétente et incubés une nuit à 37°C. Le lendemain, l'erlenmeyer contenant la souche est placé à 4°C pour la journée. 0,4 mL de cette préculture sont ajoutés à 25 mL de milieu SOB. Les bactéries cultivées sur la nuit à 18°C à 220 g jusqu'à une absorbance de 0,4 sont refroidies 10 min dans la glace. Après 15 min de centrifugation (2 500 g, 4°C), le culot est repris dans 4 mL de milieu TB froid. Après 10 min sur la glace, les cellules sont de nouveau centrifugées (2 500 g, 4°C). Elles sont resuspendues dans 1 mL de TB froid. Du DMSO est ajouté goutte à goutte jusqu'à une concentration finale de 7 % et les cellules sont incubées encore 10 min sur la glace. A cette étape les bactéries peuvent être aliquotées et stockées à -80°C.
A 50 µl de bactéries chimio-compétentes est ajouté l'ADN à transformer (≤ 100 ng) et les cellules sont incubées sur la glace pendant 20 min. Puis elles subissent un choc thermique à 42°C pendant 45 s puis sont immédiatement remises dans la glace pendant 2 - 5 min. 450 µL de milieu SOB sont ajoutés et la suspension est étalée sur un milieu solide de sélection. Les boîtes de Pétri sont incubées une nuit à 37°C.

Milieu SOB : Bacto tryptone 2 % (m/v) ; Yeast extract 0,5 % (m/v) ; NaCl 10 mM ; KCl 2,5 mM ; $MgCl_2$ 10 mM ; $MgSO_4$ 10 mM
Milieu TB : Pipes 10 M pH 7 ; $MnCl_2$ 55 mM ; $CaCl_2$ 15 mM ; KCl 250 mM
Si nécessaire ajuster le pH à 6,7 avec 5 M de soude avant d'ajouter le chlorure de manganèse.

b) Electroporation

Les bactéries cultivées à 37°C dans du milieu LB jusqu'à une absorbance comprise entre 0,5 et 1, sont refroidies 20 min dans la glace. Après 5 min de centrifugation (2 000 g, 4°C), le culot est repris dans le même volume d'eau froide. Les cellules sont à nouveau centrifugées et lavées dans 1/2 volume d'eau froide, puis reprises dans 1/25 volume de glycérol 10 % froid. Une dernière centrifugation est faite pour reprendre les cellules dans

1/200 volume de glycérol 10 % froid. A cette étape les bactéries peuvent être aliquotées et stockées à - 80°C.
La transformation de 40 µL de cellules par de l'ADN (≤ 100 ng) est réalisée à l'aide d'un appareil d'électroporation ("Gene pulser II" de BioRad) avec un voltage de 2,5 kV, une résistance de 200 Ohms et une capacité de 25 µF. La constante de temps est alors de 4,5 à 5 ms. Immédiatement après le choc électrique, 200 µL de milieu SOB ou LB froid sont ajoutés aux cellules. Elles sont alors agitées à 37°C pendant 30 min puis la suspension est étalée sur un milieu solide de sélection. Les boîtes de Pétri sont incubées une nuit à 37°C.

2) Préparation d'ADN

Tous les plasmides utilisés ont été isolés à l'aide de colonne QIAGEN provenant du QIAprep® Spin Miniprep Kit basé sur une lyse alcaline des cellules et une adsorption de l'ADN sur une membrane de silice en présence d'une forte concentration de sels. Le protocole suivi est celui décrit dans le manuel d'utilisation du manufacturier.

II. Levures

A. Souches utilisées et génotype

Les souches suivantes de la levure *Saccharomyces cerevisiae* ont été utilisées dans cette étude :

- **BY4742** : *MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0*

Les souches haploïdes, portant la délétion d'un gène, sont issues de l'une des deux banques de souches obtenues lors du *Saccharomyces* Genome Deletion Project (Winzeler et al 1999 Science 285 :901-6). Cette banque comporte l'ensemble des souches viables délétées pour une ORF du génome de *Saccharomyces cerevisiae*. Le gène délété est remplacé par une cassette *Kan*MX4 qui confère la résistance à la généticine G418.

- **SLW571WK** : *MATa myo5Δ::TRP1 bzz1Δ::kanMX4 his3-Δ200 ura3-52*
- **FY1679 :** *MATa/MATα his3-Δ200/HIS3 leu2-Δ1/LEU2 trp1-Δ63/TRP1 ura3-52/ura3-52*. Cette souche est un dérivé congénique de la souche S288C (Winston *et al.*, 1995).
- **SD100** : *MATa leu2 rme1 trp1 his3 ura3 GAL+ HMLa TOF3 mss4::HISMX6 / Ycplac111::MSS4*. Souche sauvage contrôle de SD102
- **SD102** : *MATa leu2 rme1 trp1 his3 ura3 GAL+ HMLa TOF3 mss4::HISMX6 / Ycplac111::mss4-2ts*
- **FY833** : *MATa leu2 lys2 trp1 his3 ura3-52 GAL2*. Souche sauvage contrôle de *fab1Δ*
- *fab1Δ : MATa leu2 lys2 trp1 his3 fab1::HIS3 ura3-52 GAL2*

- **MH565** : *Matα leu2-3, 112 ura3-52 his3-Δ200 trp1Δ901 lys2-801 suc2-Δ9 GAL*. Souche sauvage contrôle de MH566.
- **MH566** : *Matα leu2-3, 112 ura3-52 his3-Δ200 trp1Δ901 lys2-801 suc2-Δ9 GAL Δvps34::TRP1*.

B. Conditions et milieux de culture et conservation

La culture de la levure *Saccharomyces cerevisiae* se fait soit en milieu liquide, soit sur milieu solide. La température optimale de croissance des levures est de 30°C.

Milieu Complet YPG : extrait de levure 1 %($^p/_v$) ; bactopeptone 1 %($^p/_v$) ; glucose 2 %($^p/_v$).
Milieu Complet Synthétique (CSM ou Complete Synthetic Medium) : Yeast Nitrogen Base (YNB) 0,67 %($^p/_v$) ; glucose 2 %($^p/_v$) avec addition de tous les acides aminés et les bases.
Milieu de sélection : CSM moins un ou plusieurs acides aminés ou bases.

Tous les milieux sont stérilisés par autoclavage à 120°C sous une pression de 1,2 bar pendant 20 min. Ils peuvent être solidifiés par l'addition de 2 % ($^p/_v$) d'agar.

Les cellules sont conservées dans du milieu glycérolé (15 %) à – 80°C.

C. Transformation et isolement de l'ADN Génomique

1) Transformation

Pour faire pénétrer de l'ADN plasmidique ou des fragments d'ADN linéaires dans les cellules de levure, un traitement à l'acétate de lithium en présence de DMSO a été utilisé (Hill et al., 1991). Pour intégrer un fragment d'ADN au chromosome (insertion, délétion, remplacement), un plasmide coupé ou un fragment d'ADN amplifié par PCR et présentant des bouts francs sont utilisés pour subir une recombinaison.

La souche de levure à transformer est cultivée dans 1,5 mL d'YPG à 25 - 30°C durant une nuit sous agitation. Les cellules sont sédimentées par centrifugation (10 000 g, 30 s, T° ambiante). Elles sont resuspendues avec 10 µL d'une solution d'ADN de sperme de saumon (10 µg/µL) et 100 ng d'ADN transformant, la suspension cellulaire est vortexée puis 500 µl d'un tampon PEG-Li sont ajoutés ainsi que du DMSO à une concentration finale de 10 %. La suspension cellulaire est incubée 15 min à T° ambiante avant de subir un choc thermique à 42°C pendant 15 min. Les cellules sont lavées avec du tampon TE avant d'être étalées sur un milieu sélectif adéquat. Les transformants sont visibles après 2 - 3 jours d'incubation à 30°C.

Tampon PEG-Li : 40% de polyéthylène glycol PEG 4000 ; acétate de lithium 0,1 M ; Tris-Cl 10 mM pH 7,5 ; EDTA 1 mM

2) *Préparation d'ADN à partir de cellules de levure*

a) Méthode mécanique

Cette méthode est adaptée de Hoffman et Winston (1987). 2 mL d'une culture de levure sont centrifugés et les cellules sont resuspendues dans 500 µL de tampon Hoffman dans un microtube. Environ 500 µL de billes de verre (0,5 mm de diamètre) et 500 µL de phénol/chloroforme 1:1 sont ajoutés à cette suspension. Les cellules sont vortexées pendant 2 min. Après centrifugation (5 min, 12 000 g), le surnageant est mélangé avec 1 volume de phénol/chloroforme 1:1 . Les cellules sont vortexées pendant 20 s. Après centrifugation (5 min, 12 000 g), le surnageant est mélangé avec 0,1 volume d'acétate d'ammonium 7,5 M et 2,5 volumes d'éthanol 100 % et placé 20 min à – 20°C. L'ADN précipité est centrifugé (5 min, 12 000 g), lavé 2 fois avec 1 mL d'éthanol 75 %, séché brièvement à température ambiante et enfin resuspendu dans 50 µL d'eau.

Tampon Hoffman : NaCl 100 mM ; Tris-HCl 10 mM pH8 ; EDTA 1 mM ; SDS 0,1 % et Triton X-100 2 %

b) Méthode enzymatique

Un volume de 5 mL d'YPD est inoculé avec la souche de levure d'intérêt. Les cellules sont cultivées à 30°C jusqu'à saturation (une nuit). Les cellules sont sédimentées par centrifugation (2 000 g, 5 min) puis resuspendues dans 0,5 mL de tampon sorbitol 1 M ; Na_2EDTA 0,1 M (pH 7,5). Après ajout de 0,02 mL de Zymolyase 100 000 U à 2,5 mg/mL les cellules sont incubées 1 heure à 37°C. Après vérification du pourcentage de sphéroplastes, elles sont sédimentées par centrifugation (2 500 g, 1 min) et resuspendues dans 0.5 mL de tampon Tris-Cl 50 mM (pH 7,4), Na_2-EDTA 20 mM. Après ajout de 0,05 mL de SDS 10 %, les cellules sont incubées 30 min à 65°C pour permettre la lyse. Après centrifugation (13 000 g, 5 min) pour enlever le culot de membranes, l'ADN présent dans le surnageant est ensuite précipité avec 1 volume d'isopropanol 100 % (5 min, T° ambiante). Après une brève centrifugation (10 s), le culot d'ADN est séché à l'air libre puis repris dans 0,3 mL de TE (pH 7,4). Après ajout de 15 µL d'une solution de RNase A (1 mg/mL) l'ADN est ajouté et la réaction est incubée 30 min à 37°C. A près ajout de 0,03 mL d'acétate de potassium 3 M et de 0,2 mL d'isopropanol 100 % et une brève centrifugation, le culot d'ADN est séché à l'air libre. Il est repris dans 0,1 – 0,3mL de TE (pH 7,4).

TE : Tris-HCl 10 mM pH 7,4 ; Na_2 EDTA 1 mM

D. Techniques génétiques

La levure *Saccharomyces cerevisiae* est un champignon unicellulaire se multipliant végétativement par bourgeonnement à l'état haploïde ou diploïde. Le passage de l'état haploïde à l'état diploïde se fait par conjugaison entre deux cellules de signe opposé (*MATa* et *MAT*α). Le passage inverse se fait par méiose et sporulation d'une cellule diploïde et formation d'un asque qui contient 4 spores haploïdes : 2 *MATa* et 2 *MAT*α.

1) Conjugaison

Deux cellules haploïdes de signe opposé arrêtent leur cycle cellulaire en G1 en réponse aux phéromones et forment une protubérance (« shmoo ») vers leur partenaire pour fusionner. Le zygote ainsi formé commence aussitôt à bourgeonner. Il est reconnaissable au microscope par sa forme en feuille de trèfle.

Pour obtenir une efficacité maximale de croisement, les cellules de signe **a** et α sont striées séparément sur milieu riche et incubées à 25 ou 30°C pendant une nuit. Les cellules sont ensuite mélangées sur le même milieu et incubées pendant 6h à 25 ou 30°C. Le mélange du croisement est ensuite strié sur YPD pour isoler les zygotes à l'aide d'un micromanipulateur (Singer), ou alors il est strié sur un milieu minimum adéquat ne permettant que la croissance des cellules diploïdes (contre-sélection des souches haploïdes).

2) Sporulation

En conditions de croissance défavorables, les cellules diploïdes entrent en méiose puis forment un asque ayant une paroi très résistante contenant 4 spores haploïdes. La sporulation est induite en carençant les cellules en sources azotées et carbonées. Les cellules sont mises à pousser sur milieu riche pendant 1 ou 2 jours puis repiquées sur du milieu de sporulation (acétate de potassium 10 % ; agarose 1 %) et incubées à 25 ou 30°C pendant 4-5 jours. L'apparition des ascospores est suivie au microscope.

3) Dissection des tétrades

Afin de faire une analyse génétique de la ségrégation des gènes au cours de la méiose, les asques peuvent être rompus par digestion de leur paroi pour libérer les 4 spores qu'ils contiennent. Les cellules mises à sporuler sont digérées dans de l'eau stérile contenant de la zymolyase (1 mg/mL) pendant 10 min à température ambiante. La suspension cellulaire est étalées sur boite YPD et les 4 spores de chaque tétrade sont

séparées et déposées à des intervalles réguliers sur la surface de l'agar à l'aide de l'aiguille fine d'un micromanipulateur (Singer). Les colonies issues de spores individuelles sont visibles après quelques jours d'incubation à 25°C

III. Vecteurs de clonage

A. Plasmides spécifiques à E. coli

Tous les plasmides utilisés portent le gène de résistance à l'ampicilline.

- Série pET/D-TOPO : *pBR322 ori LacI* T7 promoter (Invitrogen). Ce vecteur permet de cloner un insert en phase avec la séquence codant pour les étiquettes 6xHistidine et V5 et d'induire la production de la protéine de fusion correspondante.

B. Plasmides navettes E. coli / S. cerevisiae

Ils possèdent une origine de réplication bactérienne, une origine de réplication de levure (centromérique ou 2µm), le gène de résistance à l'ampicilline et un gène marqueur pour la levure.

- Série pRS : plasmides centromériques ou 2 µm contenant différents gènes marqueurs de levure (Sikorski et Hieter, 1989).

- Banque de surproduction : banque de fragments génomiques de levure portés par le vecteur 2 micron YEp24 (avec le site BamHI).

- **YCplac111::MSS4 (pSH23) :** plasmide centromérique LEU2

- YCplac111::mss4-2ts (pSH23) : plasmide centromérique LEU2 porte l'allèle mss4-2 thermosensible.

IV. Manipulations concernant l'ADN

A. Détermination de la concentration en ADN

La concentration d'une solution d'ADN est mesurée par spectrophotométrie à l'aide du BioPhotometer (Eppendorf). L'absorption est lue à 260 nm. Pour un trajet optique de 1 cm, une unité d'absorbance correspond à 50 µg/mL d'ADN double brin. Le rapport entre l'absorbance à 280 nm et à 260 nm permet d'estimer la pureté de la solution. Il est théoriquement ≥ 1,8 pour une solution d'ADN bicaténaire propre.

B. Digestion par les enzymes de restriction

Les enzymes de restriction génèrent des coupures double-brin à des sites spécifiques de l'ADN. Les extrémités 5' et 3' (franches ou cohésives) engendrées sont utilisées pour cloner des fragments d'ADN dans des vecteurs. Chaque enzyme est utilisée dans des conditions (tampon et température) définies par le fournisseur.

C. Séparation électrophorétique des fragments d'ADN

Les acides nucléiques sont séparés sur gel d'agarose. L'agarose est dissout dans du tampon TAE qui sert aussi de tampon de migration. L'électrophorèse se fait dans le tampon TAE à 100 V jusqu'à ce que le front de migration atteigne le bas du gel repéré par le bleu de bromophénol présent dans le tampon de charge. Le gel est ensuite incubé pendant 5 minutes dans un bain de TAE additionné de 0,5 µg/mL de bromure d'éthidium, un agent intercalant de l'ADN, permettant de visualiser les bandes d'acides nucléiques sous lumière UV. Le poids moléculaire d'un fragment d'ADN peut être évalué par comparaison à une échelle, constituée de fragment d'ADN de poids moléculaires connus, migrant sur le même gel.

Tampon TAE : Tris-base 0,2 M ; acide acétique 0,2 M ; Na_2EDTA 5 mM pH 8
Tampon de charge (5 X) : Saccharose 25 g ; Na_2EDTA 0,5 M pH 8 10 µL ; 1 pointe de spatule de bleu de bromophénol ; qsp 50 mL d'eau distillée

D. Séquençage de l'ADN

Le séquençage a été effectué avec le séquenceur APE Biosystems (modèle 373) à l'IBMP (Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, Strasbourg).

E. Amplification enzymatique de l'ADN par PCR (Polymerase Chain Reaction)

L'ADN à amplifier (100 ng) est dénaturé à 95°C pendant 5 min avant amplification en présence des amorces spécifiques sens et antisens (50 pmol), de dNTPs (0,2 mM), d'ADN polymérase de *Thermophilus aquaticus* (Taq polymérase, 2 U/mL) et de son tampon. Le volume réactionnel final est de 50 µL. Un cycle de PCR est constitué d'une dénaturation de l'ADN (30 s, 95°C), d'une hybridation des amorces (30 s, selon la T° de fusion des amorces) et d'une élongation (temps variable selon la taille du fragment à amplifier, 72°C). L'amplification est réalisée pendant 25 - 30 cycles. Un dixième de la réaction est déposé sur gel d'agarose pour vérifier l'efficacité et la spécificité de l'amplification.

Pour un clonage nécessitant des extrémités franches et pas d'erreur, la Pfu DNA Polymerase peut remplacer la Taq polymerase car elle corrige les erreurs par son activité 3'-5' exonuclease et génère des extrémités franches dues à l'absence d'activité terminal-transferase.

V. Manipulations concernant les protéines

A. Préparation d'extraits protéiques bruts

1) Extraits protéiques de Saccharomyces cerevisiae

Les levures provenant d'une culture de 100 mL (Abs_{600nm} = 0,6 - 0,8) sont sédimentées par centrifugation (1 500 g, 10 min) et lavées avec 5 mL de tampon XB. Le culot est alors repris dans ½ volume du culot de tampon de broyage puis ½ volume de billes de verre (0,4 mm de diamètre) est ajouté. Cette suspension est fortement agitée au vortex pendant 30 s puis refroidie une minute dans la glace. Cette agitation est répétée 6 à 10 fois. Après centrifugation (15 000 g, 15 min, 4°C), le surnageant est récupéré.

Tampon XB : KCl 100 mM, $MgCl_2$ 2 mM, $CaCl_2$ 0,1 mM, EGTA 5 mM, DTT 1 mM, ATP 1 mM, HEPES 10 mM pH 7,7 Saccharose 50 mM

2) Extraits protéiques d'Escherichia coli

La surproduction de la protéine d'intérêt est induite par ajout d'IPTG (0 ,1 – 1 mM final) à 37°C (à optimiser selon les cas) pendant 2 – 4 h dans une culture bactérienne en phase exponentielle de croissance. Les bactéries issues d'une culture de 50 mL sont sédimentées par centrifugation puis resuspendues dans 2 mL de PBS contenant des inhibiteurs de protéases et du PMSF 1mM. Les cellules sont ensuite lysées en réalisant 4 cycles de sonication de 30 s à 28 % d'amplitude (Vibracell, Bioblock). Entre chaque cycle, les cellules sont refroidies 30 s dans la glace. Chaque extrait est centrifugé (13 000 g, 15 min, 4°C) et le surnageant est récupéré. Selon les cas, le culot contenant les débris cellulaires ainsi que les corps d'inclusion est conservé.

B. Expression, purification et utilisation d'une protéine fusionnée à 6xHistidines

1) La protéine est soluble

L'extrait protéique préparé par sonication (Section C.1)b) est équilibré : à 186 µL extrait protéique *E. coli* sont ajoutés 2 µL d'imidazole 1 M (C_f = 10 mM) et 12 µL de NaCl 5 M (C_f = 300 mM) pour obtenir un volume final de 200 µL. Les billes de Ni-NTA-agarose sont équilibrées dans le tampon de fixation (50 µL de billes à 50 % pour 200 µL d'extrait protéique) : à 60 µL de billes Ni-NTA-agarose à 50 % dans l'éthanol sont ajoutés 200 µL de tampon de fixation, elles sont alors mélangées et centrifugées (6 000 g, 30 s, 4°C). Le surnageant est aspiré et les billes sont reprises dans 50 µL de tampon de fixation. 200 µL d'extrait protéique équilibré sont alors fixés pendant 30 – 60 min à 4°C sur 50 µL de billes lavées avec une agitation douce. Elles sont ensuite centrifugées et lavées 4 fois avec 400 µL de tampon de fixation. Ensuite les billes sont éluées avec 50 µL de tampon d'élution pendant 10 min à température ambiante. Après centrifugation, la surnageant est récupéré et le degré de pureté est estimé sur SDS-PAGE.

Tampon de fixation : Imidazole 10 mM ; NaCl 300 mM ; PMSF 1 mM ; PBS 1X ; Inhibiteurs de protéases (Complete, EDTA-free, Roche)
Tampon d'élution : Imidazole 450 mM ; NaCl 300 mM ; PMSF 1 mM ; PBS 1X ; Inhibiteurs de protéases

2) La protéine est insoluble

Le culot obtenu après sonication dans la section C.1)b est repris dans 5 mL de tampon de solubilisation et est incubé 1 nuit à T° ambiante. Il est ensuite centrifugé (10 000 g, 30 min) et le surnageant est dilué au ¼ avec du PBS 2X et ajusté à pH8 si nécessaire. (La concentration finale en SDS est de 0,25 % et en β-mercaptoéthanol de 5 mM ce qui permet la fixation sur billes Ni-NTA). Les 20 mL de surnageant dilué sont mélangés avec 500 - 600 µL de billes Ni-NTA prélavées avec PBS 2X ; SDS 0,2 % ; β-mercaptoéthanol 0,5 mM ; pH 8 et incubés sur roue 1-2 h à T° ambiante puis centrifugés (6 000 g, 30 s). Après 2 lavages avec du PBS 2X ; SDS 0,2% ; β-mercaptoéthanol 0,5 mM ; pH 8, les billes sont lavée encore 2 fois avec du PBS 2X ; SDS 0,05 % ; β-mercaptoéthanol 0,5 mM ; pH 8. La protéine d'intérêt est alors éluée par une incubation de 10 min avec 500 - 600 µL de PBS 1X ; SDS 0,05% ; β-mercaptoéthanol 0,5 mM ; imidazole 100 mM (à ajuster selon la protéine et ses contaminations) ; inhibiteurs de protéases ; pH 7,4. Après une brève centrifugation, la protéine purifiée est récupérée.

Tampon de solubilisation : 40 mM bicarbonate de sodium ; pH 9,6 ; β-mercaptoéthanol 20 mM ; SDS 1% ; Inhibiteurs de protéases

C. Conservation des extraits protéiques

Une fois réalisés, les extraits protéiques peuvent être aliquotés et conservés à -80°C pendant plusieurs mois. Pour cela les extraits sont congelés en les immergeant dans un bain d'azote liquide avant d'être placés à - 80°C.

D. Détermination de la concentration en protéines

La concentration en protéine des extraits est déterminée selon la méthode de Bradford (1976). Cette méthode utilise la propriété du bleu de Coomassie à se fixer non spécifiquement sur les acides aminés nucléophiles, le complexe colorant-protéine formé montre un maximum d'absorption à 595 nm (lue sur BioPhotometer, Eppendorf). Selon la gamme étalon établie avec de la BSA, la concentration de l'extrait protéique est déterminée par ajout du colorant de Bradford (BioRad) (800 µl H_2O + 200 µl de Bradford) à 2 - 5 µL d'extrait.

E. Séparation électrophorétique des protéines

Les protéines peuvent être séparées sur gel dénaturant de polyacrylamide (en présence de SDS) par migration dans un champ électrique. Le gel comprend 2 parties de composition et de pH différents. Dans la partie supérieure, un gel de concentration faiblement réticulé concentre les protéines et permet une résolution plus fine des bandes. Le gel de séparation dans la partie inférieure fractionne les protéines selon leur taille.

Le gel de séparation est coulé au ¾ de la hauteur des plaques. 1 mL d'isopropanol ou d'eau est déposé pour aplanir la surface du gel et ainsi obtenir une séparation bien nette des protéines. Après polymérisation, le gel de concentration est coulé et un peigne y est immédiatement inséré. L'échantillon protéique à analyser est dénaturé 5 min à 95°C dans le tampon de charge puis déposé dans les puits. L'électrophorèse se fait dans le tampon de migration à 100 – 150 V jusqu'à ce que le front de migration atteigne le bas du gel. Le poids moléculaire d'une protéine peut être évalué par comparaison à une échelle, constituée de protéines de poids moléculaires connus, migrant sur le même gel.

Gel de séparation 5 – 15 % : Acrylamide/ bisacrylamide (30/0,8) 5 – 15 % ; Tris-HCl 375 mM pH 8,8 ; SDS 0,1 % ; persulfate d'ammonium 0,1 % ; TEMED 0,1 %
Gel de concentration 4 % : Acrylamide/ bisacrylamide (30/0,8) 4 % ; Tris-HCl 125 mM pH 6,8 ; SDS 0,1% ; persulfate d'ammonium 0,1 % ; TEMED 0,1 %

Tampon de charge 1X : Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8 ; SDS 2 % ; glycérol 10 % ; β-mercaptoéthanol 2 % ; bleu de bromophénol 0,1 %
Tampon de migration : Tris-HCl 20 mM ; Glycine 192 mM ; SDS 1 g/L

F. Coloration des protéines dans un gel de polyacrylamide-SDS

Après migration sur gel SDS-PAGE, les protéines peuvent être révélées par une coloration au bleu de Coomassie. Après démoulage, le gel est incubé à température ambiante, sous agitation, pendant 5 min dans une solution de fixation puis 1 h dans une solution de coloration. Il est alors baigné dans une solution de décoloration jusqu'à ce que les bandes soient bien visibles. La limite de détection de cette méthode de coloration est d'environ 0,4 µg de protéines.

Solution de fixation : Ethanol 50 % ; acide acétique 10 %
Solution de coloration : Ethanol 45 % ; acide acétique 10 % ; Coomassie Blue R250 0,25 %
Solution de décoloration : Ethanol 45 % ; acide acétique 0,7 %

G. Western blotting

Les protéines séparées sur gel SDS-PAGE sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose renforcée (Schleicher & Schuell BA 83 0,22 µm). Le transfert liquide s'effectue pendant 1 h à 4°C à une intensité de 85 V avec le système BioRad. Le transfert des protéines sur la membrane peut être vérifié par une coloration réversible au rouge Ponceau.

Après blocage des sites de fixation non spécifiques (1 h à T° ambiante dans du tampon de blocage), la membrane est incubée (1 h à T° ambiante ou une nuit à 4°C) avec l'anticorps primaire dilué dans du tampon de blocage. Après 3 lavages dans du tampon de blocage, elle est incubée 1 h avec l'anticorps secondaire dilué dans du TBS-T. Ce deuxième anticorps est couplé à la peroxydase HRP (Horseradish Peroxidase). La membrane est alors lavée avec du TBS-T et la révélation des bandes protéiques se fait en utilisant le kit de détection ECL+™ (Enhanced Chemiluminescence, Amersham Pharmacia), basé sur l'émission de lumière après oxydation du luminol par la peroxydase, et en exposant ensuite un film autoradiographique.

Tampon de transfert : Tris-HCl 25 mM ; glycine 190 mM ; SDS 0,1 % ; éthanol 20 % pH8,3
TBS-T : Tris-HCl 50 mM pH8 ; NaCl 150 mM ; Tween-20 0,1 %
Tampon de blocage : TBS-T; lait écrémé en poudre 5 %

H. « Protoarray™ » (Invitrogen)

C'est une lame de verre surmontée par une membrane de nitrocellulose où ont été déposées, en duplicate, 4088 protéines de *S. cerevisiae*. Après avoir équilibré la température de la lame à 4°C pendant 15 min, elle est incubée avec du tampon de blocage PBS-T 1 h avec une légère agitation (~50 g). Ensuite la protéine contrôle, calmoduline kinase (Cmk1p) étiquetée V5 en N-terminal, (5 µg/mL) ou la protéine étiquetée V5 diluée dans du tampon d'hybridation (50 µg/mL) est ajoutée sur la membrane de nitrocellulose, la lame est incubée 90 min. Après 3 lavages de 10 minutes avec du tampon d'hybridation et une légère agitation, la lame est incubée 30 min avec l'anticorps Anti-V5-Alexa Fluor® 647 (160 µg/mL) sous une légère agitation. Après 3 lavages de 10 minutes avec du tampon d'hybridation et une légère agitation, la lame est centrifugée (800 g, 5 min, T° ambiante) et séchée à l'obscurité 30 - 60 min à T° ambiante. La fluorescence des points d'hybridation est lue à 635 nm grâce à un scanner GenePix® Personal 4100A et analysée par le logiciel GenePix® Pro 6.0. Puis les données sont traitées grâce au logiciel Prospector Analyser (Invitrogen).

Tampon de blocage PBST : PBS 1X ; BSA1 % ; Tween-20 0,1 %

Tampon d'hybridation PBS 1X ; $MgCl_2$ 5 mM ; DTT 0,5 mM ; Triton X-100 0,05 % ; Glycérol 5 % ; BSA 1 %

I. PIP Strip Membrane

Le PIP Strip est une membrane de nitrocellulose sur laquelle différents lipides ont été déposés. Après blocage des sites de fixation non spécifiques (1 h dans du tampon de blocage), la membrane PIP Strip (P-6001, Echelon Biosciences) est incubée (1 h à T° ambiante ou une nuit à 4°C) avec la protéine d'intérêt fusionnée avec des étiquettes 6xHis et V5 (1 µg/mL). Après 3 lavages dans du tampon de blocage, elle est incubée 1 h avec l'anticorps primaire de souris anti - V5 (MCA1360, AbD Serotec) dilué au 1/1000ème dans du tampon de blocage. Après 3 lavages dans du PBS-T, la membrane est incubée 1 h avec l'anticorps secondaire anti-souris IgG-HRP dilué au 1/5000ème dans du PBS-T. La membrane est alors lavée avec du PBS-T et la révélation des interactions lipides-protéines se fait en utilisant le kit de détection ECL+™ (Enhanced Chemiluminescence, Amersham Pharmacia) et en exposant ensuite un film autoradiographique.

PBS-T : PBS 1X ; Tween-20 0,1 % (v/v)

Tampon de blocage : PBS-T ; BSA (sans acide gras) 1 % (m/v) bien dissoudre sous agitation pendant 30 - 60 minutes

VI. Méthodes cytologiques appliquées à la levure

A. Fixation des cellules

Les cellules en phase exponentielle de croissance (Abs_{600nm} ~ 0,3) sont fixées et perméabilisées dans le milieu de culture par ajout de formaldéhyde (3,7 % final) et de Triton X-100 (0,04 % final). Les cellules sont ensuite incubées sous agitation pendant 30 min à la T° de croissance. Après centrifugation (1 500 g, 2 min), elles sont resuspendues avec 1 mL de tampon de fixation puis incubées 2 h à T° ambiante. Elles sont ensuite lavées 3 fois avec du PBS. Les cellules ainsi fixées peuvent être conservées pendant quelques jours à 4°C.

Tampon de fixation : K_2HPO_4 35 mM ; KH_2PO_4 35 mM ; 4 % formaldéhyde ; $MgCl_2$ 0,5 mM

B. Marquage par des colorants

1) Phalloïdine couplée au TRITC

La phalloïdine, une toxine issue de l'amanite phalloïde, a la propriété de se fixer spécifiquement sur les polymères d'actine. Cette toxine couplée à un fluorochrome permet la visualisation du cytosquelette d'actine dans les cellules.
Les cellules fixées sont centrifugées et resuspendues dans 15 µL de PBS contenant 1 µM de phalloïdine-TRITC (Sigma). Après 90 min d'incubation à T° ambiante dans l'obscurité, les cellules sont lavées avec du PBS, montées entre lame et lamelle et observées au microcope à épifluorescence.

2) Lucifer Yellow CH

Le Lucifer Yellow carbohydrazide (LY) est une petite molécule fluorescente utilisée pour l'étude de l'endocytose en phase fluide. Ce marqueur est internalisé dans les cellules au niveau de la membrane plasmique et accumulé dans les vacuoles.

Les cellules de levure sont cultivées dans du milieu minimum à 30°C jusqu'à Abs_{600nm} ~ 0,3. Un mL de la culture est centrifugé (4000 g, 1 min) et les cellules sont resuspendues dans 90 µL de milieu minimum et 10 µL du stock de LY (concentration finale de 4 mg/mL). Un trou dans le couvercle permet un échange gazeux pendant l'incubation de 1,5 à 2 h. Après 3 lavage avec du Tampon Phosphate de Potassium, les cellules sont montées entre lame et lamelle scellées avec de l'agarose 1,6 % et observées au microscope à fluorescences avec le filtre FITC. Dans les cellules sauvages, la fluorescence s'accumule dans les vacuoles (visible en optique DIC).

Tampon Phosphate de Potassium : 50 mM de tampon phosphate de potassium pH 7,5 ; 10 mM NaF ; 10 mM NaN_3

3) Calcofluor White

Ce colorant (Fluorescent Brightener 28, Sigma) se lie spécifiquement à la chitine qui est un composant de la paroi cellulaire chez *S.cerevisiae*. Il est utilisé pour visualiser les anneaux de chitine laissés sur la paroi cellulaire de la cellule mère après séparation du bourgeon.

Les cellules fixées sont resuspendues dans 100 µL de PBS contenant 200 µg/mL de Calcofluor White et incubées 5 min à l'abri de la lumière. Après 5 lavages dans du PBS, elles sont montées entre lame et lamelle et observées au microscope à fluorescence avec le filtre DAPI.

C. Microscopie : acquisition et traitement des images

L'observation des cellules se fait avec un microscope à épifluorescence Zeiss AxioVert 200 équipé des objectifs Zeiss (ApoFluo Neofluar X20 et a Plan-Fluar x100). Différents filtres on été utilisés en fonction du fluorophore observé. Les prises de vues sont réalisées avec une caméra Hammamatsu CoolSnap HSQ2 piloté par le logiciel du microscope.

Le traitement des images a été fait à l'aide du logiciel Image J (Abramoff et al., 2004).

Marquage	Filtre	Excitation maximale (nm)	Emission maximale (nm)
LY	GFP	490	520
GFP	GFP	490	511
Calcofluor White	DAPI	360	440
Phalloidine-TRITC	TRITC	541	572

Tableau 13 : Filtres utilisés pour observer les cellules en fonction des fluorophores.

Nom	Base	Séquence	Utilisation
OCO1	25	CACCATGAGTGCAGATTTATCGA TT	Clonage de *BZZ1* dans vecteur pET101/151/D-TOPO
OCO2	21	TTTACAGTAACTTGTAGGAAA	Clonage de *BZZ1* dans vecteur pET101/D-TOPO
OCO3	21	TCATTTACAGTAACTTGTAGG	Clonage de *BZZ1* dans vecteur pET151D-TOPO
OCO4	18	TTGTTAGGGGCAGAGCCT	Séquençage de *BZZ1*
OCO5	18	TCATCATCATGCCATACT	Séquençage de *BZZ1*
OCO6	21	ATCGCCAGTCACTATGGCGTG	Séquençage des inserts de YEp24
OCO7	19	AACAGTCCCCCGGCCACGG	Séquençage des inserts de YEp24
OCO8	21	AAAGTCGGTTGATAACTGATC	Clonage du domaine FCH de Bzz1p dans pET101/D-TOPO
OCO9	22	TTTATCCTTAGTTCTATTTGCC	Clonage du domaine F-BAR dans pET101/D-TOPO
OCO10	20	CCAGAACTACCTGTGAAATT	Vérification insertion de *TRP1*
OCO11	20	ATTCTACCAAATCGGTAGTC	Vérification délétion de *MYO5*
OCO12	18	TGGGTAATCCTGTGTTGA	Vérification délétion de *BZZ1*
OCO13	20	CATTAAGGATTCACTCAGCC	Vérification délétion de *AST2*
OCO14	18	GGATGAACGTTATCGGTG	Vérification délétion de YER128W
OCO15	19	AGTTATTGTTCCCATTCGC	Vérification délétion de YDR428C
OCO16	18	TTGGCAGTTCCTAGCTAG	Vérification délétion de YCR076C
OCO17	19	GTCAAATTTGTTGACGGCA	Vérification délétion de YPT32
OCO18	17	TGTAGGTCACAGAACGT	Vérification délétion de *AIP1*
OCO19	63	GGTTCAGGATCCGGCGGATTTGG AGGGTCAGGATCTGGCTTTATTC GTACGCTGCAGGTCGAC	Etiquetage de *YCR076C* en C-terminal avec GFP (fragment S3)
OCO20	64	ACTAAATATCACAATAAACAAAGT ACTAAAATAAACACCCATTTAATC GATGAATTCGAGCTCG	Etiquetage de *YCR076C* en C-terminal avec GFP (fragment S2)
OCO21	60	TAAGAACAGTGGCCAATACGAAT TTAACCGCTTTATAGAACGGATCC CCGGGTTAATTAA	Remplacement de *MYO5* par *HIS3MX6*
OCO22	60	TTTGCTCGTATAGAGTATATACTC GCTAAATACATTTTGAGAATTCGA GCTCGTTTAAAC	Remplacement de *MYO5* par *HIS3MX6*

Nom	Base	Séquence	Utilisation
Bzz1.S1	73	ATGAGCGGAAATCTATCCTTAAACGCCAACTACTACATTACTTGCAATAAAAATGCGTACGCTGCAGGTCGAC	Etiquetage de *BZZ1* en N-terminal avec GFP (fragment S1)
Bzz1.S2	73	AAAAAGTGGCGGCCAGGGAAAATATTTAATAGTTTCAGTTCATTCCTTCGTTCA-ATCGATGAATTCGAGCTCG	Etiquetage de *BZZ1* en C-terminal avec GFP (fragment S3)
Bzz1.S3	72	ACATATGGTGAATGTGACGGATTGAAAGGTCTATTTCCTACAAGTTACTGTAAA-CGTACGCTGCAGGTCGAC	Etiquetage de *BZZ1* en C-terminal avec GFP (fragment S2)
Bzz1.S4	75	TATGGGTTTCCTTAAATGAATCTTTAATTTCATTACCAATCGATAAATCTGCACTCATCGATGAATTCTCTGTCG	Etiquetage de *BZZ1* en N-terminal avec GFP (fragment S4)
trp	20	CCACACACTTTAACGAGCAT	Vérification insertion *TRP1*
ccpgcc	74	CCCAAGCTTGGGTGCTGGAGCAGGCGCTGGAGCCGGCTGGGATTGTTGTCCAGGTTGTTGTAAGTAAGTACGTA	Séquence codante pour la construction d'une étiquette tétracystéine
ccp-3	22	TACGTACTTACTTACAACAACC	Construction par PCR d'une étiquette tétracystéine, amorce en 3'
ccp-5	17	CCCAAGCTTGGGTGCTG	Construction par PCR d'une étiquette tétracystéine, amorce en 5'
bzz1_ccp	66	GAATGTGACGGATTGAAAGGTCTGTTTCCTACAAGTTACTGTAAA-GGTGCTGGAGCAGGCGCTGGA	Etiquetage *BZZ1* par étiquette tétracystéine-*TRP1*
bzz1_trp	66	AAGTGGCGGCCAGGGAAAATATTTAATAGTTTCAGTTCATTCCTT-CCTCGAGGCCAGAAGACTAAG	Etiquetage *BZZ1* par étiquette tétracystéine-*TRP1*Insertion de *TRP1* en 5' de *BZZ1*
hof1_ccp	66	GGATTAATTCCCTATAATTTCATTCAGCTACTGCATCAA-GGTGCTGGAGCAGGCGCTGGA	Etiquetage *HOF1* par étiquette tétracystéine-*TRP1*
hof1_trp	66	ACTTTTTTTTCTTTTATCAGAAAACTAGTAAAATTGATATAGATCG-CCTCGAGGCCAGAAGACTAAG	Etiquetage *HOF1* par étiquette tétracystéine-*TRP1*
las17_ccp	63	AAAGTGGGAGCTCATGACGATATGGACAATGGTGATGATTGG-GGTGCTGGAGCAGGCGCTGGA	Etiquetage *LAS17* par étiquette tétracystéine-*TRP1*
las17_trp	66	AAATTACATATTTTCTATAACAGTAGTTTCATCTTTGTTTGCATT-CCTCGAGGCCAGAAGACTAAG	Etiquetage *LAS17* par étiquette tétracystéine-*TRP1*
pym6-1	22	GGACATATTGTCGTTAGAACGC	Séquençage étiquette tétracystéine clonée dans plasmide pYM6
pym6-2	25	GAGTAGAGACTGATGGTATCAAGGA	Séquençage étiquette tétracystéine clonée dans plasmide pYM6 et vérification insertion *TRP1*

Tableau 14. Oligonucléotides utilisés au cours de ce travail.

Conclusion

Conclusion

Mon travail de doctorat a permis de synthétiser et développer une coumarine photoactivable possédant un motif Ni-NTA ayant des propriétés photochimiques et photophysiques bonnes voire excellentes : pas de fluorescence, libération rapide et quasi-totale du luorophore après une irradiation lumineuse. De plus, l'entrée dans les cellules HeLa du dérivé fluorescent laisse présager l'entrée de la coumarine photoactivable. Une fois, les derniers contrôles effectués, liaison du motif Ni-NTA à une étiquette poly-histidine et une confirmation de la non-toxicité de la sonde, il sera alors possible d'étudier la dynamique de protéines intervenant dans le cytosquelette d'actine. D'autre part, l'étude des interactions protéine-protéines et protéine-lipides de Bzz1p a permis de montrer que Bzz1p semblent avoir de nombreux partenaires protéiques cellulaires, certainement par une interaction via ses domaines SH3. Bzz1p est aussi capable via son domaine FCH de lier des phophoinositides. Ce qui suggère que Bzz1p serait un connecteur entre le cytosquelette d'actine et la membrane plasmique. Une fois, ces interactions confirmées, la dynamique de Bzz1p pourra être visualisé grâce à la coumarine photoactivable nouvellement conçue.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

Adams, S. R., Campbell, R. E., Gross, L. A., Martin, B. R., Walkup, G. K., Yao, Y., Llopis, J., and Tsien, R. Y. (2002). *New biarsenical ligands and tetracysteine motifs for protein labeling in vitro and in vivo: synthesis and biological applications*. **J Am Chem Soc** 124, 6063-6076.

Adams, S. R., and Tsien, R. Y. (1993). *Controlling cell chemistry with caged compounds*. **Annu Rev Physiol** 55, 755-784.

Agard, N. J., Prescher, J. A., and Bertozzi, C. R. (2004). *A strain-promoted [3 + 2] azide-alkyne cycloaddition for covalent modification of biomolecules in living systems*. **J Am Chem Soc** 126, 15046-15047.

Aguilar, R. C., Watson, H. A., and Wendland, B. (2003). *The yeast Epsin Ent1 is recruited to membranes through multiple independent interactions*. **J Biol Chem** 278, 10737-10743.

Amberg, D. C. (1998). *Three-dimensional imaging of the yeast actin cytoskeleton through the budding cell cycle*. **Mol Biol Cell** 9, 3259-3262.

Anderson, B. L., Boldogh, I., Evangelista, M., Boone, C., Greene, L. A., and Pon, L. A. (1998). *The Src homology domain 3 (SH3) of a yeast type I myosin, Myo5p, binds to verprolin and is required for targeting to sites of actin polarization*. **J Cell Biol** 141, 1357-1370.

Aspenstrom, P. (1997). *A Cdc42 target protein with homology to the non-kinase domain of FER has a potential role in regulating the actin cytoskeleton*. **Curr Biol** 7, 479-487.

Aspenstrom, P., Fransson, A., and Richnau, N. (2006). *Pombe Cdc15 homology proteins: regulators of membrane dynamics and the actin cytoskeleton*. **Trends Biochem Sci** 31, 670-679.

Ayscough, K. R. (1998). *In vivo functions of actin-binding proteins*. **Curr Opin Cell Biol** 10, 102-111.

Ayscough, K. R., Eby, J. J., Lila, T., Dewar, H., Kozminski, K. G., and Drubin, D. G. (1999). *Sla1p is a functionally modular component of the yeast cortical actin cytoskeleton required for correct localization of both Rho1p-GTPase and Sla2p, a protein with talin homology*. **Mol Biol Cell** 10, 1061-1075.

Ayscough, K. R., Stryker, J., Pokala, N., Sanders, M., Crews, P., and Drubin, D. G. (1997). *High rates of actin filament turnover in budding yeast and roles for actin in establishment and maintenance of cell polarity revealed using the actin inhibitor latrunculin-A*. **J Cell Biol** 137, 399-416.

B

Badour, K., Zhang, J., and Siminovitch, K. A. (2003). *The Wiskott-Aldrich syndrome protein: forging the link between actin and cell activation*. **Immunol Rev** 192, 98-112.

Balasubramanian, M. K., Feoktistova, A., McCollum, D., and Gould, K. L. (1996). *Fission yeast Sop2p: a novel and evolutionarily conserved protein that interacts with Arp3p and modulates profilin function*. **Embo J** 15, 6426-6437.

Benedetti, H., Raths, S., Crausaz, F., and Riezman, H. (1994). *The END3 gene encodes a protein that is required for the internalization step of endocytosis and for actin cytoskeleton organization in yeast*. **Mol Biol Cell** 5, 1023-1037.

Benli, M., Doring, F., Robinson, D. G., Yang, X., and Gallwitz, D. (1996). *Two GTPase isoforms, Ypt31p and Ypt32p, are essential for Golgi function in yeast*. **Embo J** 15, 6460-6475.

Berthelot, T., Talbot, J. C., Laïn, G., Déleris, G., and Latxague, L. (2005). *Synthesis of Nε-(7-diethylaminocoumarin-3-carboxyl)- and Nε-(7-methoxycoumarin-3-carboxyl)-L-Fmoc lysine as tools for protease cleavage detection by fluorescence*. **J Peptide Sci** 11, 153-160.

Bi, E. (2001). *Cytokinesis in budding yeast: the relationship between actomyosin ring function and septum formation*. **Cell Struct Funct** 26, 529-537.

Bi, E., Maddox, P., Lew, D. J., Salmon, E. D., McMillan, J. N., Yeh, E., and Pringle, J. R. (1998). *Involvement of an actomyosin contractile ring in Saccharomyces cerevisiae cytokinesis*. **J Cell Biol** 142, 1301-1312.

Bochet, C. G. (2002). *Photolabile protecting groups and linkers*. **J Chem Soc - Perkin Trans 1**, 125-142.

Bompard, G., and Caron, E. (2004). *Regulation of WASP/WAVE proteins: Making a long story short*. **J Cell Biol** 166, 957-962.

Botstein, D., Chervitz, S. A., and Cherry, J. M. (1997). *Yeast as a model organism*. **Science** 277, 1259-1260.

Bradford, M. M. (1976). *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. **Anal Biochem** 72, 248-254.

Bretscher, A. (1993). *Microfilaments and membranes*. **Curr Opin Cell Biol** 5, 653-660.

Bui, E., Bayle, J. P., Perez, F., Liebert, L., and Courtieu, J. (1990). *Syntheses of nematogen copper complexes using halogen substituted ligands*. **Liquid Crystals** 8, 513-526.

Bulina, M. E., Chudakov, D. M., Britanova, O. V., Yanushevich, Y. G., Staroverov, D. B., Chepurnykh, T. V., Merzlyak, E. M., Shkrob, M. A., Lukyanov, S., and Lukyanov, K. A. (2006). *A genetically encoded photosensitizer*. **Nat Biotechnol** 24, 95-99.

C

Cabib, E., Drgonova, J., and Drgon, T. (1998). *Role of small G proteins in yeast cell polarization and wall biosynthesis*. **Annu Rev Biochem** 67, 307-333.

Cali, B. M., Doyle, T. C., Botstein, D., and Fink, G. R. (1998). *Multiple functions for actin during filamentous growth of Saccharomyces cerevisiae*. **Mol Biol Cell** 9, 1873-1889.

Cao, H., Weller, S., Orth, J. D., Chen, J., Huang, B., Chen, J. L., Stamnes, M., and McNiven, M. A. (2005). *Actin and Arf1-dependent recruitment of a cortactin-dynamin complex to the Golgi regulates post-Golgi transport*. **Nat Cell Biol** 7, 483-492.

Carlier, M. F. (1991). *Actin: protein structure and filament dynamics*. **J Biol Chem** 266, 1-4.

Carlier, M. F., Le Clainche, C., Wiesner, S., and Pantaloni, D. (2003). *Actin-based motility: from molecules to movement*. **Bioessays** 25, 336-345.

Carlier, M. F., Nioche, P., Broutin-L'Hermite, I., Boujemaa, R., Le Clainche, C., Egile, C., Garbay, C., Ducruix, A., Sansonetti, P., and Pantaloni, D. (2000). *GRB2 links signaling to actin assembly by enhancing interaction of neural Wiskott-Aldrich syndrome protein (N-WASp) with actin-related protein (ARP2/3) complex*. **J Biol Chem** 275, 21946-21952.

Casamayor, A., and Snyder, M. (2002). *Bud-site selection and cell polarity in budding yeast*. **Curr Opin Microbiol** 5, 179-186.

Chang, L., Adams, R. D., and Saltiel, A. R. (2002). *The TC10-interacting protein CIP4/2 is required for insulin-stimulated Glut4 translocation in 3T3L1 adipocytes*. **Proc Natl Acad Sci U S A** 99, 12835-12840.

Chant, J., and Herskowitz, I. (1991). *Genetic control of bud site selection in yeast by a set of gene products that constitute a morphogenetic pathway*. **Cell** 65, 1203-1212.

Chapman, S., Oparka, K. J., and Roberts, A. G. (2005). *New tools for in vivo fluorescence tagging*. **Curr Opin Plant Biol** 8, 565-573.

Chen, I., Howarth, M., Lin, W., and Ting, A. Y. (2005). *Site-specific labeling of cell surface proteins with biophysical probes using biotin ligase*. **Nat Methods** 2, 99-104.

Chen, I., and Ting, A. Y. (2005). *Site-specific labeling of proteins with small molecules in live cells*. **Curr Opin Biotechnol** 16, 35-40.

Chin, J. W., Santoro, S. W., Martin, A. B., King, D. S., Wang, L., and Schultz, P. G. (2002). *Addition of p-azido-L-phenylalanine to the genetic code of Escherichia coli*. **J Am Chem Soc** 124, 9026-9027.

Chitu, V., and Stanley, E. R. (2007). *Pombe Cdc15 homology (PCH) proteins: coordinators of membrane-cytoskeletal interactions*. **Trends Cell Biol** 17, 145-156.

Chowdhury, S., Smith, K. W., and Gustin, M. C. (1992). *Osmotic stress and the yeast cytoskeleton: phenotype-specific suppression of an actin mutation*. **J Cell Biol** 118, 561-571.

Chudakov, D. M., Lukyanov, S., and Lukyanov, K. A. (2005). *Fluorescent proteins as a toolkit for in vivo imaging*. **Trends Biotechnol** 23, 605-613.

Chvatchko, Y., Howald, I., and Riezman, H. (1986). *Two yeast mutants defective in endocytosis are defective in pheromone response*. **Cell** 46, 355-364.

Clackson, T., Yang, W., Rozamus, L. W., Hatada, M., Amara, J. F., Rollins, C. T., Stevenson, L. F., Magari, S. R., Wood, S. A., Courage, N. L., *et al.* (1998). *Redesigning an FKBP-ligand interface to generate chemical dimerizers with novel specificity*. **Proc Natl Acad Sci U S A** 95, 10437-10442.

Cody, C. W., Prasher, D. C., Westler, W. M., Prendergast, F. G., and Ward, W. W. (1993). *Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the Aequorea green-fluorescent protein*. **Biochem** 32, 1212-1218.

Collins, S. R., Kemmeren, P., Zhao, X. C., Greenblatt, J. F., Spencer, F., Holstege, F. C., Weissman, J. S., and Krogan, N. J. (2007). *Toward a comprehensive atlas of the physical interactome of Saccharomyces cerevisiae*. **Mol Cell Proteomics** 6, 439-450.

Corrie, J. E. T., and Trentham, D. R. (1993). *Caged nucleotides and neurotransmitters*, Vol 2 (Ed.Wiley, New York).

Cory, G. O., Cramer, R., Blanchoin, L., and Ridley, A. J. (2003). *Phosphorylation of the WASP-VCA domain increases its affinity for the Arp2/3 complex and enhances actin polymerization by WASP*. **Mol Cell** 11, 1229-1239.

Cote, J. F., Chung, P. L., Theberge, J. F., Halle, M., Spencer, S., Lasky, L. A., and Tremblay, M. L. (2002). *PSTPIP is a substrate of PTP-PEST and serves as a scaffold guiding PTP-PEST toward a specific dephosphorylation of WASP*. **J Biol Chem** 277, 2973-2986.

D

Dangles, O., Guibe, F., Balavoine, G., Lavielle, S., and Marquet, A. (1987). *Selective cleavage of the allyl and (allyloxy)carbonyl groups through palladium-catalyzed hydrostannolysis with tributyltin hydride. Application to the selective protection-*

deprotection of amino acid derivatives and in peptide synthesis. **J Org Chem** 52, 4984-4993.

Dayel, M. J., Holleran, E. A., and Mullins, R. D. (2001). *Arp2/3 complex requires hydrolyzable ATP for nucleation of new actin filaments*. **Proc Natl Acad Sci U S A** 98, 14871-14876.

De Hostos, E. L. (1999). *The coronin family of actin-associated proteins*. **Trends Cell Biol** 9, 345-350.

Deiters, A., Cropp, T. A., Mukherji, M., Chin, J. W., Anderson, J. C., and Schultz, P. G. (2003). *Adding amino acids with novel reactivity to the genetic code of Saccharomyces cerevisiae*. **J Am Chem Soc** 125, 11782-11783.

Denk, W., Piston, D. W., and Webb, W. W. (1995). Two-photon molecular excitation in laser-scanning microscopy, In *Handbook of Biological Confocal Microscopy 2nd edn*, J. B. Pawley, ed. (Plenum Press, New York), pp. 445-458.

Denk, W., Strickler, J. H., and Webb, W. W. (1990). *Two-photon laser scanning fluorescence microscopy*. **Science** 248, 73-76.

Denk, W., and Svoboda, K. (1997). *Photon upmanship: why multiphoton imaging is more than a gimmick*. **Neuron** 18, 351-357.

Derry, J. M., Ochs, H. D., and Francke, U. (1994). *Isolation of a novel gene mutated in Wiskott-Aldrich syndrome*. **Cell** 79, following 922.

Dorman, G., and Prestwich, G. D. (2000). *Using photolabile ligands in drug discovery and development*. **Trends Biotechnol** 18, 64-77.

Dorn, I. T., Neumaier, K. R., and Tampé, R. (1998). *Molecular Recognition of Histidine-Tagged Molecules by Metal-Chelating Lipids Monitored by Fluorescence Energy Transfer and Correlation Spectroscopy*. **J Am Chem Soc** 120, 2753-2763.

Drubin, D. G., Jones, H. D., and Wertman, K. F. (1993). *Actin structure and function: roles in mitochondrial organization and morphogenesis in budding yeast and identification of the phalloidin-binding site*. **Mol Biol Cell** 4, 1277-1294.

Dulic, V., Egerton, M., Elguindi, I., Raths, S., Singer, B., and Riezman, H. (1991). *Yeast endocytosis assays*. **Methods Enzymol** 194, 697-710.

Dulic, V., and Riezman, H. (1989). *Characterization of the END1 gene required for vacuole biogenesis and gluconeogenic growth of budding yeast*. **Embo J** 8, 1349-1359.

Duncan, M. C., Cope, M. J. T. V., Goode, B. L., Wendland, B., and Drubin, D. G. (2001). *Yeast Eps15-like endocytic protein, Pan1p, activates the Arp2/3 complex*. **Nat Cell Biol** 3, 687-690.

Dunn, T. M., and Shortle, D. (1990). *Null alleles of SAC7 suppress temperature-sensitive actin mutations in Saccharomyces cerevisiae*. **Mol Cell Biol** 10, 2308-2314.

Dupre, S., Urban-Grimal, D., and Haguenauer-Tsapis, R. (2004). *Ubiquitin and endocytic internalization in yeast and animal cells*. **Biochim Biophys Acta** 1695, 89-111.

E

Eden, S., Rohatgi, R., Podtelejnikov, A. V., Mann, M., and Kirschner, M. W. (2002). *Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck*. **Nature** 418, 790-793.

Endris, V., Wogatzky, B., Leimer, U., Bartsch, D., Zatyka, M., Latif, F., Maher, E. R., Tariverdian, G., Kirsch, S., Karch, D., and Rappold, G. A. (2002). *The novel Rho-GTPase activating gene MEGAP/ srGAP3 has a putative role in severe mental retardation*. **Proc Natl Acad Sci U S A** 99, 11754-11759.

Engels, J., and Schlaeger, E. J. (1977). *Synthesis, structure, and reactivity of adenosine cyclic 3',5'-phosphate benzyl triesters*. **J Med Chem** 20, 907-911.

Engqvist-Goldstein, A. E., and Drubin, D. G. (2003). *Actin assembly and endocytosis: from yeast to mammals*. **Annu Rev Cell Dev Biol** 19, 287-332.

Evangelista, M., Blundell, K., Longtine, M. S., Chow, C. J., Adames, N., Pringle, J. R., Peter, M., and Boone, C. (1997). *Bni1p, a yeast formin linking Cdc42p and the actin cytoskeleton during polarized morphogenesis*. **Science** 276, 118-122.

Evangelista, M., Klebl, B. M., Tong, A. H., Webb, B. A., Leeuw, T., Leberer, E., Whiteway, M., Thomas, D. Y., and Boone, C. (2000). *A role for myosin-I in actin assembly through interactions with Vrp1p, Bee1p, and the Arp2/3 complex*. **J Cell Biol** 148, 353-362.

F

Faix, J., and Grosse, R. (2006). *Staying in shape with formins*. **Dev Cell** 10, 693-706.

Falet, H., Hoffmeister, K. M., Neujahr, R., Italiano, J. E., Jr., Stossel, T. P., Southwick, F. S., and Hartwig, J. H. (2002). *Importance of free actin filament barbed ends for Arp2/3 complex function in platelets and fibroblasts*. **Proc Natl Acad Sci U S A** 99, 16782-16787.

Fankhauser, C., Reymond, A., Cerutti, L., Utzig, S., Hofmann, K., and Simanis, V. (1995). *The S. pombe cdc15 gene is a key element in the reorganization of F-actin at mitosis*. **Cell** 82, 435-444.

Fujita, H., Katoh, H., Ishikawa, Y., Mori, K., and Negishi, M. (2002). *Rapostlin is a novel effector of Rnd2 GTPase inducing neurite branching*. **J Biol Chem** 277, 45428-45434.

Fukuoka, M., Suetsugu, S., Miki, H., Fukami, K., Endo, T., and Takenawa, T. (2001). *A novel neural Wiskott-Aldrich syndrome protein (N-WASP) binding protein, WISH, induces Arp2/3 complex activation independent of Cdc42*. **J Cell Biol** 152, 471-482.

G

Gagny, B., Wiederkehr, A., Dumoulin, P., Winsor, B., Riezman, H., and Haguenauer-Tsapis, R. (2000). *A novel EH domain protein of Saccharomyces cerevisiae, Ede1p, involved in endocytosis*. **J Cell Sci** 113 (Pt 18), 3309-3319.

Gaietta, G., Deerinck, T. J., Adams, S. R., Bouwer, J., Tour, O., Laird, D. W., Sosinsky, G. E., Tsien, R. Y., and Ellisman, M. H. (2002). *Multicolor and electron microscopic imaging of connexin trafficking*. **Science** 296, 503-507.

Gautreau, A., Ho, H. Y., Li, J., Steen, H., Gygi, S. P., and Kirschner, M. W. (2004). *Purification and architecture of the ubiquitous Wave complex*. **Proc Natl Acad Sci U S A** 101, 4379-4383.

Gavin, A. C., Aloy, P., Grandi, P., Krause, R., Boesche, M., Marzioch, M., Rau, C., Jensen, L. J., Bastuck, S., Dumpelfeld, B., *et al.* (2006). *Proteome survey reveals modularity of the yeast cell machinery*. **Nature** 440, 631-636.

Geli, M. I., Lombardi, R., Schmelzl, B., and Riezman, H. (2000). *An intact SH3 domain is required for myosin I-induced actin polymerization*. **EMBO J** 19, 4281-4291.

Geli, M. I., and Riezman, H. (1996). *Role of type I myosins in receptor-mediated endocytosis in yeast*. **Science** 272, 533-535.

George, N., Pick, H., Vogel, H., Johnsson, N., and Johnsson, K. (2004). *Specific labeling of cell surface proteins with chemically diverse compounds*. **J Am Chem Soc** 126, 8896-8897.

Germann, M., Swain, E., Bergman, L., and Nickels, J. T., Jr. (2005). *Characterizing the sphingolipid signaling pathway that remediates defects associated with loss of the yeast amphiphysin-like orthologs, Rvs161p and Rvs167p*. **J Biol Chem** 280, 4270-4278.

Giepmans, B. N., Adams, S. R., Ellisman, M. H., and Tsien, R. Y. (2006). *The fluorescent toolbox for assessing protein location and function*. **Science** 312, 217-224.

Goeldner, M. (2005). Caging of ATP and Glutamate: a Comparative Analysis, In *Dynamics Studies in Biology: Phototriggers, Photoswitches and Caged Biomolecules*, M. Goeldner, and R. S. Givens, eds. (Wiley-VCH), pp. 76-94.

Goeldner, M., and Givens, R. S., eds. (2005). *Dynamics Studies in Biology: Phototriggers, Photoswitches and Caged Biomolecules*, In (Wiley-VCH).

Goldsmith, C. R., Jaworski, J., Sheng, M., and Lippard, S. J. (2006). *Selective labeling of extracellular proteins containing polyhistidine sequences by a fluorescein-nitrilotriacetic acid conjugate*. **J Am Chem Soc** 128, 418-419.

Goley, E. D., and Welch, M. D. (2006). *The ARP2/3 complex: an actin nucleator comes of age*. **Nat Rev Mol Cell Biol** 7, 713-726.

Goode, B. L., and Rodal, A. A. (2001). *Modular complexes that regulate actin assembly in budding yeast*. **Curr Opin Microbiol** 4, 703-712.

Goode, B. L., Rodal, A. A., Barnes, G., and Drubin, D. G. (2001). *Activation of the Arp2/3 complex by the actin filament binding protein Abp1p*. **J Cell Biol** 153, 627-634.

Göppert-Mayer, M. (1931). *Uber Elementarakte mit zwei Quantensprugen*. **Annalen der Physik** 9, 273-294.

Göppert, M. (1929). *Über die Wahrscheinlichkeit des Zusammenwirkens zweier Lichtquanten in einem Elementarakt*. **Naturwissenschaften** 17, 932.

Gottlieb, T. A., Ivanov, I. E., Adesnik, M., and Sabatini, D. D. (1993). *Actin microfilaments play a critical role in endocytosis at the apical but not the basolateral surface of polarized epithelial cells*. **J Cell Biol** 120, 695-710.

Griffin, B. A., Adams, S. R., Jones, J., and Tsien, R. Y. (2000). *Fluorescent labeling of recombinant proteins in living cells with FlAsH*. **Methods Enzymol** 327, 565-578.

Griffin, B. A., Adams, S. R., and Tsien, R. Y. (1998). *Specific covalent labeling of recombinant protein molecules inside live cells*. **Science** 281, 269-272.

Guignet, E. G., Hovius, R., and Vogel, H. (2004). *Reversible site-selective labeling of membrane proteins in live cells*. **Nat Biotechnol** 22, 440-444.

Guinamard, R., Aspenstrom, P., Fougereau, M., Chavrier, P., and Guillemot, J. C. (1998). *Tyrosine phosphorylation of the Wiskott-Aldrich syndrome protein by Lyn and Btk is regulated by CDC42*. **FEBS Lett** 434, 431-436.

Guthrie, C., and Fink, G. R. (1991). *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology*, Vol 169 (Academic Press, San Diego).

H

Harborth, J., Elbashir, S. M., Bechert, K., Tuschl, T., and Weber, K. (2001). *Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs*. **J Cell Sci** 114, 4557-4565.

Harsay, E., and Bretscher, A. (1995). *Parallel secretory pathways to the cell surface in yeast*. **J Cell Biol** 131, 297-310.

Hatchard, C. G., and Parker, C. A. (1956). *A new sensitive chemical actinometer. II. Potassium ferrioxalate as a standard chemical actinometer*. **Proc Roy Soc** A235, 518-536.

Hauser, C. T., and Tsien, R. Y. (2007). *A hexahistidine-Zn2+-dye label reveals STIM1 surface exposure*. **Proc Natl Acad Sci U S A** 104, 3693-3697.

Helmchen, F., and Denk, W. (2002). *New developments in multiphoton microscopy*. **Curr Opin Neurobiol** 12, 593-601.

Helmchen, F., and Denk, W. (2005). *Deep tissue two-photon microscopy*. **Nat Methods** 2, 932-940.

Henry, K. R., D'Hondt, K., Chang, J. S., Nix, D. A., Cope, M. J., Chan, C. S., Drubin, D. G., and Lemmon, S. K. (2003). *The actin-regulating kinase Prk1p negatively regulates Scd5p, a suppressor of clathrin deficiency, in actin organization and endocytosis*. **Curr Biol** 13, 1564-1569.

Hicke, L. (1999). *Gettin' down with ubiquitin: turning off cell-surface receptors, transporters and channels*. **Trends Cell Biol** 9, 107-112.

Higgs, H. N., and Pollard, T. D. (2000). *Activation by Cdc42 and PIP(2) of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASp) stimulates actin nucleation by Arp2/3 complex*. **J Cell Biol** 150, 1311-1320.

Higgs, H. N., and Pollard, T. D. (2001). *Regulation of actin filament network formation through ARP2/3 complex: activation by a diverse array of proteins*. **Annu Rev Biochem** 70, 649-676.

Hino, N., Hayashi, A., Sakamoto, K., and Yokoyama, S. (2006). *Site-specific incorporation of non-natural amino acids into proteins in mammalian cells with an expanded genetic code*. **Nat Protoc** 1, 2957-2962.

Ho, C.-H., Limberis, L., Caldwell, K. D., and Stewart, R. J. (1998). *A Metal-Chelating Pluronic for Immobilization of Histidine-Tagged Proteins at Interfaces: Immobilization of Firefly Luciferase on Polystyrene Beads*. **Langmuir** 14, 3889-3894.

Ho, H. Y., Rohatgi, R., Lebensohn, A. M., Le, M., Li, J., Gygi, S. P., and Kirschner, M. W. (2004). *Toca-1 mediates Cdc42-dependent actin nucleation by activating the N-WASP-WIP complex*. **Cell** 118, 203-216.

Ho, Y., Gruhler, A., Hellbut, A., Bader, G. D., Moore, L., Adams, S.-U., Millar, A., Taylor, P., Bennett, K., Boutiller, K., *et al.* (2002). *Systematic identification of protein complexes in Saccharomyces cerevisiae by mass spectrometry*. **Nature** 415, 180-183.

Hochuli, E., Dobeli, H., and Schacher, A. (1987). *New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues*. **J Chromatogr** 411, 177-184.

Holmes, K. C., Popp, D., Gebhard, W., and Kabsch, W. (1990). *Atomic model of the actin filament*. **Nature** 347, 44-49.

Holtzman, D. A., Yang, S., and Drubin, D. G. (1993). *Synthetic-lethal interactions identify two novel genes, SLA1 and SLA2, that control membrane cytoskeleton assembly in Saccharomyces cerevisiae*. **J Cell Biol** 122, 635-644.

Howard, J. P., Hutton, J. L., Olson, J. M., and Payne, G. S. (2002). *Sla1p serves as the targeting signal recognition factor for NPFX(1,2)D-mediated endocytosis*. **J Cell Biol** 157, 315-326.

Huckaba, T. M., Gay, A. C., Pantalena, L. F., Yang, H. C., and Pon, L. A. (2004). *Live cell imaging of the assembly, disassembly, and actin cable-dependent movement of endosomes and actin patches in the budding yeast, Saccharomyces cerevisiae*. **J Cell Biol** 167, 519-530.

Humphries, C. L., Balcer, H. I., D'Agostino, J. L., Winsor, B., Drubin, D. G., Barnes, G., Andrews, B. J., and Goode, B. L. (2002). *Direct regulation of Arp2/3 complex activity and function by the actin binding protein coronin*. **J Cell Biol** 159, 993-1004.

Hussain, N. K., Jenna, S., Glogauer, M., Quinn, C. C., Wasiak, S., Guipponi, M., Antonarakis, S. E., Kay, B. K., Stossel, T. P., Lamarche-Vane, N., and McPherson, P.

S. (2001). *Endocytic protein intersectin-l regulates actin assembly via Cdc42 and N-WASP*. **Nat Cell Biol** 3, 927-932.

I

Icking, A., Matt, S., Opitz, N., Wiesenthal, A., Muller-Esterl, W., and Schilling, K. (2005). *NOSTRIN functions as a homotrimeric adaptor protein facilitating internalization of eNOS*. **J Cell Sci** 118, 5059-5069.

Ignatova, Z., and Gierasch, L. M. (2004). *Monitoring protein stability and aggregation in vivo by real-time fluorescent labeling*. **Proc Natl Acad Sci U S A** 101, 523-528.

Iida, K., and Yahara, I. (1999). *Cooperation of two actin-binding proteins, cofilin and Aip1, in Saccharomyces cerevisiae*. **Genes Cells** 4, 21-32.

Imai, K., Nonoyama, S., and Ochs, H. D. (2003). *WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein) gene mutations and phenotype*. **Curr Opin Allergy Clin Immunol** 3, 427-436.

Innocenti, M., Zucconi, A., Disanza, A., Frittoli, E., Areces, L. B., Steffen, A., Stradal, T. E., Di Fiore, P. P., Carlier, M. F., and Scita, G. (2004). *Abi1 is essential for the formation and activation of a WAVE2 signalling complex*. **Nat Cell Biol** 6, 319-327.

Insall, R., Muller-Taubenberger, A., Machesky, L., Kohler, J., Simmeth, E., Atkinson, S. J., Weber, I., and Gerisch, G. (2001). *Dynamics of the Dictyostelium Arp2/3 complex in endocytosis, cytokinesis, and chemotaxis*. **Cell Motil Cytoskeleton** 50, 115-128.

Ito, T., Chiba, T., Ozawa, R., Yoshida, M., Hattori, M., and Sakaki, Y. (2001). *A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome*. **Proc Natl Acad Sci U S A** 98, 4569-4574.

Itoh, T., Erdmann, K. S., Roux, A., Habermann, B., Werner, H., and De Camilli, P. (2005). *Dynamin and the actin cytoskeleton cooperatively regulate plasma membrane invagination by BAR and F-BAR proteins*. **Dev Cell** 9, 791-804.

J

Jedd, G., Mulholland, J., and Segev, N. (1997). *Two new Ypt GTPases are required for exit from the yeast trans-Golgi compartment*. **J Cell Biol** 137, 563-580.

Johnsson, N., and Johnsson, K. (2003). *A fusion of disciplines: chemical approaches to exploit fusion proteins for functional genomics*. **Chembiochem** 4, 803-810.

Johnsson, N., and Johnsson, K. (2007). *Chemical tools for biomolecular imaging*. **ACS Chem Biol** 2, 31-38.

Jonsdottir, G. A., and Li, R. (2004). *Dynamics of Yeast Myosin I Evidence for a Possible Role in Scission of Endocytic Vesicles*. **Curr Biol** 14, 1604-1609.

Ju, W., Morishita, W., Tsui, J., Gaietta, G., Deerinck, T. J., Adams, S. R., Garner, C. C., Tsien, R. Y., Ellisman, M. H., and Malenka, R. C. (2004). *Activity-dependent regulation of dendritic synthesis and trafficking of AMPA receptors*. **Nat Neurosci** 7, 244-253.

Juillerat, A., Gronemeyer, T., Keppler, A., Gendreizig, S., Pick, H., Vogel, H., and Johnsson, K. (2003). *Directed evolution of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase for efficient labeling of fusion proteins with small molecules in vivo*. **Chem Biol** 10, 313-317.

Juliano, R. L., and Haskill, S. (1993). *Signal transduction from the extracellular matrix*. **J Cell Biol** 120, 577-585.

K

Kabsch, W., and Holmes, K. C. (1995). *The actin fold*. **Faseb J** 9, 167-174.

Kabsch, W., Mannherz, H. G., Suck, D., Pai, E. F., and Holmes, K. C. (1990). *Atomic structure of the actin:DNase I complex*. **Nature** 347, 37-44.

Kaiser, W., and Garrett, C. G. B. (1961). *Two-photon excitation in CaF2:Eu++*. **Phys Rev Letters** 7, 229-231.

Kaksonen, M., Sun, Y., and Drubin, D. G. (2003). *A pathway for association of receptors, adaptors, and actin during endocytic internalization*. **Cell** 115, 475-487.

Kaksonen, M., Toret, C. P., and Drubin, D. G. (2005). *A modular design for the clathrin- and actin-mediated endocytosis machinery*. **Cell** 123, 305-320.

Kamioka, Y., Fukuhara, S., Sawa, H., Nagashima, K., Masuda, M., Matsuda, M., and Mochizuki, N. (2004). *A novel dynamin-associating molecule, formin-binding protein 17, induces tubular membrane invaginations and participates in endocytosis*. **J Biol Chem** 279, 40091-40099.

Kelly, A. E., Kranitz, H., Doetsch, V., and Mullins, R. D. (2006). *Actin Binding to the Central Domain of WASP/Scar Proteins Plays a Critical Role in the Activation of the Arp2/3 Complex*. **J Biol Chem** 281, 10589-10597.

Keppler, A., Gendreizig, S., Gronemeyer, T., Pick, H., Vogel, H., and Johnsson, K. (2003). *A general method for the covalent labeling of fusion proteins with small molecules in vivo*. **Nat Biotechnol** 21, 86-89.

Keppler, A., Kindermann, M., Gendreizig, S., Pick, H., Vogel, H., and Johnsson, K. (2004a). *Labeling of fusion proteins of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase with small molecules in vivo and in vitro*. **Methods** 32, 437-444.

Keppler, A., Pick, H., Arrivoli, C., Vogel, H., and Johnsson, K. (2004b). *Labeling of fusion proteins with synthetic fluorophores in live cells*. **Proc Natl Acad Sci U S A** 101, 9955-9959.

Kessels, M. M., and Qualmann, B. (2004). *The syndapin protein family: linking membrane trafficking with the cytoskeleton*. **J Cell Sci** 117, 3077-3086.

Kolluri, R., Tolias, K. F., Carpenter, C. L., Rosen, F. S., and Kirchhausen, T. (1996). *Direct interaction of the Wiskott-Aldrich syndrome protein with the GTPase Cdc42*. **Proc Natl Acad Sci U S A** 93, 5615-5618.

Konig, K. (2000). *Multiphoton microscopy in life sciences*. **J Microsc** 200, 83-104.

Kovar, D. R. (2006). *Arp2/3 ATP hydrolysis: to branch or to debranch?* **Nat Cell Biol** 8, 783-785.

Kreishman-Deitrick, M., Goley, E. D., Burdine, L., Denison, C., Egile, C., Li, R., Murali, N., Kodadek, T. J., Welch, M. D., and Rosen, M. K. (2005). *NMR Analyses of the Activation of the Arp2/3 Complex by Neuronal Wiskott-Aldrich Syndrome Protein*. **Biochemistry** 44, 15247-15256.

Krogan, N. J., Cagney, G., Yu, H., Zhong, G., Guo, X., Ignatchenko, A., Li, J., Pu, S., Datta, N., Tikuisis, A. P., *et al.* (2006). *Global landscape of protein complexes in the yeast Saccharomyces cerevisiae*. **Nature** 440, 637-643.

Kubler, E., and Riezman, H. (1993). *Actin and fimbrin are required for the internalization step of endocytosis in yeast*. **Embo J** 12, 2855-2862.

L

Landgraf, C., Panni, S., Montecchi-Palazzi, L., Castagnoli, L., Schneider-Mergener, J., Volkmer-Engert, R., and Cesareni, G. (2004). *Protein interaction networks by proteome peptide scanning*. **PLoS Biol** 2, E14.

Lata, S., Reichel, A., Brock, R., Tampe, R., and Piehler, J. (2005). *High-affinity adaptors for switchable recognition of histidine-tagged proteins*. **J Am Chem Soc** 127, 10205-10215.

Lazar, T., Gotte, M., and Gallwitz, D. (1997). *Vesicular transport: how many Ypt/Rab-GTPases make a eukaryotic cell?* **Trends Biochem Sci** 22, 468-472.

Lazzarino, D. A., Boldogh, I., Smith, M. G., Rosand, J., and Pon, L. A. (1994). *Yeast mitochondria contain ATP-sensitive, reversible actin-binding activity*. **Mol Biol Cell** 5, 807-818.

Lechler, T., Shevchenko, A., and Li, R. (2000). *Direct involvement of yeast type I myosins in Cdc42-dependent actin polymerization*. **J Cell Biol** 148, 363-373.

Lee, W. L., Bezanilla, M., and Pollard, T. D. (2000). *Fission yeast myosin-I, Myo1p, stimulates actin assembly by Arp2/3 complex and shares functions with WASp*. **J Cell Biol** 151, 789-800.

Li, R. (1997). *Bee1, a yeast protein with homology to Wiscott-Aldrich syndrome protein, is critical for the assembly of cortical actin cytoskeleton*. **J Cell Biol** 136, 649-658.

Lippincott, J., and Li, R. (1998). *Sequential assembly of myosin II, an IQGAP-like protein, and filamentous actin to a ring structure involved in budding yeast cytokinesis*. **J Cell Biol** 140, 355-366.

Lippincott, J., and Li, R. (2000). *Involvement of PCH family proteins in cytokinesis and actin distribution*. **Microsc Res Techn** 49, 168-172.

Lodish, H. F., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M., Zipursky, S. L., and Darnell, J. (2003). *Molecular cell biology*, 5th edn (W.H. Freeman and Company, New York).

Lorenz, M., Popp, D., and Holmes, K. C. (1993). *Refinement of the F-actin model against X-ray fiber diffraction data by the use of a directed mutation algorithm*. **J Mol Biol** 234, 826-836.

Los, G. V., Darzins, A., Karassina, N., Zimprich, C., Learish, R., McDougall, M. G., Encell, L. P., Friedman-Ohana, R., Wood, M., Vidugiris, G., *et al*. (2005). *HaloTag™ Interchangeable Labeling Technology for Cell Imaging and Protein Capture*. **Promega Cell Notes** 11, 2-6.

Loudwig, S., Specht, A., and Goeldner, M. (2002). *Caged compounds, the photolabile precursors of bioactive molecules. Developments and prospects*. **Actualite Chimique**, 7-12.

Lukyanov, K. A., Chudakov, D. M., Lukyanov, S., and Verkhusha, V. V. (2005). *Photoactivatable fluorescent proteins*. **Nat Rev Mol Cell Biol** 6, 885-890.

Luna, E. J., and Hitt, A. L. (1992). *Cytoskeleton--plasma membrane interactions*. **Science** 258, 955-964.

M

Madania, A., Dumoulin, P., Grava, S., Kitamoto, H., Scharer-Brodbeck, C., Soulard, A., Moreau, V., and Winsor, B. (1999). *The Saccharomyces cerevisiae homologue of human Wiskott-Aldrich syndrome protein Las17p interacts with the Arp2/3 complex*. **Mol Biol Cell** 10, 3521-3538.

Marks, K. M., Braun, P. D., and Nolan, G. P. (2004a). *A general approach for chemical labeling and rapid, spatially controlled protein inactivation*. **Proc Natl Acad Sci U S A** 101, 9982-9987.

Marks, K. M., and Nolan, G. P. (2006). *Chemical labeling strategies for cell biology*. **Nat Methods** 3, 591-596.

Marks, K. M., Rosinov, M., and Nolan, G. P. (2004b). *In vivo targeting of organic calcium sensors via genetically selected peptides*. **Chem Biol** 11, 347-356.

Marriott, G., ed. (1998). *Caged Compounds*, In **Methods in Enzymology**.

Matz, M. V., Labas, Y. A., and Ugalde, J. (2006). *Evolution of function and color in GFP-like proteins*. **Methods Biochem Anal** 47, 139-161.

May, R. C. (2001). *The Arp2/3 complex: a central regulator of the actin cytoskeleton*. **Cell Mol Life Sci** 58, 1607-1626.

McCray, J. A., and Trentham, D. R. (1989). *Properties and uses of photoreactive caged compounds*. **Annu Rev Biophys Biophys Chem** 18, 239-270.

McDermott, M. F. (2004). *A common pathway in periodic fever syndromes*. **Trends Immunol** 25, 457-460.

Megonigal, M. D., Cheung, N. K., Rappaport, E. F., Nowell, P. C., Wilson, R. B., Jones, D. H., Addya, K., Leonard, D. G., Kushner, B. H., Williams, T. M., *et al.* (2000). *Detection of leukemia-associated MLL-GAS7 translocation early during chemotherapy with DNA topoisomerase II inhibitors*. **Proc Natl Acad Sci U S A** 97, 2814-2819.

Miki, H., Miura, K., and Takenawa, T. (1996). *N-WASP, a novel actin-depolymerizing protein, regulates the cortical cytoskeletal rearrangement in a PIP2-dependent manner downstream of tyrosine kinases*. **Embo J** 15, 5326-5335.

Miki, H., Sasaki, T., Takai, Y., and Takenawa, T. (1998). *Induction of filopodium formation by a WASP-related actin-depolymerizing protein N-WASP*. **Nature** 391, 93-96.

Milburn, T., Matsubara, N., Billington, A. P., Udgaonkar, J. B., Walker, J. W., Carpenter, B. K., Webb, W. W., Marque, J., Denk, W., McCray, J. A., and et al. (1989). *Synthesis, photochemistry, and biological activity of a caged photolabile acetylcholine receptor ligand*. **Biochemistry** 28, 49-55.

Millard, T. H., Sharp, S. J., and Machesky, L. M. (2004). *Signalling to actin assembly via the WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein)-family proteins and the Arp2/3 complex*. **Biochem J** 380, 1-17.

Miller, L. W., and Cornish, V. W. (2005). *Selective chemical labeling of proteins in living cells*. **Curr Opin Chem Biol** 9, 56-61.

Mirey, G., Soulard, A., Orange, C., Friant, S., and Winsor, B. (2005). *SH3 domain-containing proteins and the actin cytoskeleton in yeast*. **Biochem Soc Trans** 33, 1247-1249.

Mitchison, T. J. (1989). *Polewards microtubule flux in the mitotic spindle: evidence from photoactivation of fluorescence*. **J Cell Biol** 109, 637-652.

Mitchison, T. J., Sawin, K. E., and Theriot, J. A. (1994). *Caged fluorescent probes for monitoring cytoskeleton dynamics*, Vol 2 (Academic Press, New York).

Mitchison, T. J., Sawin, K. E., Theriot, J. A., Gee, K., and Mallavarapu, A. (1998). *Caged fluorescent probes*. **Methods Enzymol** 291, 63-78.

Mitsunobu, O. (1981). *The Use of Diethylazodicarboxylate and Triphenylphosphine in Synthesis and Transformations of Natural Products*. **Synthesis** 1, 1-28.

Moreau, V., Galan, J. M., Devilliers, G., Haguenauer-Tsapis, R., and Winsor, B. (1997). *The yeast actin-related protein Arp2p is required for the internalization step of endocytosis*. **Mol Biol Cell** 8, 1361-1375.

Moreau, V., Madania, A., Martin, R. P., and Winson, B. (1996). *The Saccharomyces cerevisiae actin-related protein Arp2 is involved in the actin cytoskeleton*. **J Cell Biol** 134, 117-132.

Moseley, J. B., and Goode, B. L. (2005). *Differential Activities and Regulation of Saccharomyces cerevisiae Formin Proteins Bni1 and Bnr1 by Bud6*. **J Biol Chem** 280, 28023-28033.

Moseley, J. B., and Goode, B. L. (2006). *The yeast actin cytoskeleton: from cellular function to biochemical mechanism*. **Microbiol Mol Biol Rev** 70, 605-645.

Mulholland, J., Preuss, D., Moon, A., Wong, A., Drubin, D., and Botstein, D. (1994). *Ultrastructure of the yeast actin cytoskeleton and its association with the plasma membrane*. **J Cell Biol** 125, 381-391.

Mulholland, J., Wesp, A., Riezman, H., and Botstein, D. (1997). *Yeast actin cytoskeleton mutants accumulate a new class of Golgi-derived secretary vesicle*. **Mol Biol Cell** 8, 1481-1499.

Mullins, R. D., Heuser, J. A., and Pollard, T. D. (1998). *The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments*. **Proc Natl Acad Sci U S A** 95, 6181-6186.

Mullins, R. D., Stafford, W. F., and Pollard, T. D. (1997). *Structure, subunit topology, and actin-binding activity of the Arp2/3 complex from Acanthamoeba*. **J Cell Biol** 136, 331-343.

Munn, A. L., Stevenson, B. J., Geli, M. I., and Riezman, H. (1995). *end5, end6, and end7: mutations that cause actin delocalization and block the internalization step of endocytosis in Saccharomyces cerevisiae*. **Mol Biol Cell** 6, 1721-1742.

N

Newpher, T. M., Smith, R. P., Lemmon, V., and Lemmon, S. K. (2005). *In vivo dynamics of clathrin and its adaptor-dependent recruitment to the actin-based endocytic machinery in yeast*. **Dev Cell** 9, 87-98.

Nobes, C. D., and Hall, A. (1995). *Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia*. **Cell** 81, 53-62.

Novick, P., and Botstein, D. (1985). *Phenotypic analysis of temperature-sensitive yeast actin mutants*. **Cell** 40, 405-416.

O

Oikawa, T., Yamaguchi, H., Itoh, T., Kato, M., Ijuin, T., Yamazaki, D., Suetsugu, S., and Takenawa, T. (2004). *PtdIns(3,4,5)P3 binding is necessary for WAVE2-induced formation of lamellipodia*. **Nat Cell Biol** 6, 420-426.

Ormo, M., Cubitt, A. B., Kallio, K., Gross, L. A., Tsien, R. Y., and Remington, S. J. (1996). *Crystal structure of the Aequorea victoria green fluorescent protein*. **Science** 273, 1392-1395.

Ozaki-Kuroda, K., Yamamoto, Y., Nohara, H., Kinoshita, M., Fujiwara, T., Irie, K., and Takai, Y. (2001). *Dynamic localization and function of Bni1p at the sites of directed growth in Saccharomyces cerevisiae*. **Mol Cell Biol** 21, 827-839.

P

Palmer, R. E., Sullivan, D. S., Huffaker, T., and Koshland, D. (1992). *Role of astral microtubules and actin in spindle orientation and migration in the budding yeast, Saccharomyces cerevisiae*. **J Cell Biol** 119, 583-593.

Pan, F., Egile, C., Lipkin, T., and Li, R. (2004). *ARPC1/Arc40 Mediates the Interaction of the Actin-related Protein 2 and 3 Complex with Wiskott-Aldrich Syndrome Protein Family Activators*. **J Biol Chem** 279, 54629-54636.

Panchal, R. G., Ruthel, G., Kenny, T. A., Kallstrom, G. H., Lane, D., Badie, S. S., Li, L., Bavari, S., and Aman, M. J. (2003a). *In vivo oligomerization and raft localization of Ebola virus protein VP40 during vesicular budding*. **Proc Natl Acad Sci U S A** 100, 15936-15941.

Panchal, S. C., Kaiser, D. A., Torres, E., Pollard, T. D., and Rosen, M. K. (2003b). *A conserved amphipathic helix in WASP/Scar proteins is essential for activation of Arp2/3 complex*. **Nat Struct Biol** 10, 591-598.

Patchornik, A., Amit, B., and Woodward, R. B. (1970). *Photosensitive protecting groups*. **J Am Chem Soc** 92, 6333-6335.

Pedelacq, J.-D., Cabantous, S., Tran, T., Terwilliger, T. C., and Waldo, G. S. (2006). *Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein*. **Nat Biotechnol** 24, 79-88.

Pelliccioli, A. P., and Wirz, J. (2002). *Photoremovable protecting groups: reaction mechanisms and applications*. **Photochem Photobiol Sci** 1, 441-458.

Peter, B. J., Kent, H. M., Mills, I. G., Vallis, Y., Butler, P. J., Evans, P. R., and McMahon, H. T. (2004). *BAR domains as sensors of membrane curvature: the amphiphysin BAR structure*. **Science** 303, 495-499.

Pickles, L. M., Roe, S. M., Hemingway, E. J., Stifani, S., and Pearl, L. H. (2002). *Crystal structure of the C-terminal WD40 repeat domain of the human Groucho/TLE1 transcriptional corepressor*. **Structure** 10, 751-761.

Poch, O., and Winsor, B. (1997). *Who's who among the Saccharomyces cerevisiae actin-related proteins? A classification and nomenclature proposal for a large family*. **Yeast** 13, 1053-1058.

Poskanzer, K. E., Marek, K. W., Sweeney, S. T., and Davis, G. W. (2003). *Synaptotagmin I is necessary for compensatory synaptic vesicle endocytosis in vivo*. **Nature** 426, 559-563.

Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., Prendergast, F. G., and Cormier, M. J. (1992). *Primary structure of the Aequorea victoria green-fluorescent protein*. **Gene** 111, 229-233.

Pruyne, D., and Bretscher, A. (2000a). *Polarization of cell growth in yeast*. **J Cell Sci** 113 (Pt 4), 571-585.

Pruyne, D., and Bretscher, A. (2000b). *Polarization of cell growth in yeast. I. Establishment and maintenance of polarity states*. **J Cell Sci** 113, 365-375.

Ptacek, J., Devgan, G., Michaud, G., Zhu, H., Zhu, X., Fasolo, J., Guo, H., Jona, G., Breitkreutz, A., Sopko, R., *et al.* (2005). *Global analysis of protein phosphorylation in yeast*. **Nature** 438, 679-684.

Q

Qualmann, B., Roos, J., DiGregorio, P. J., and Kelly, R. B. (1999). *Syndapin I, a synaptic dynamin-binding protein that associates with the neural Wiskott-Aldrich syndrome protein*. **Mol Biol Cell** 10, 501-513.

Quinlan, M. E., Heuser, J. E., Kerkhoff, E., and Mullins, R. D. (2005). *Drosophila Spire is an actin nucleation factor*. **Nature** 433, 382-388.

Quintero-Monzon, O., Rodal, A. A., Strokopytov, B., Almo, S. C., and Goode, B. L. (2005). *Structural and functional dissection of the Abp1 ADFH actin-binding domain reveals versatile in vivo adapter functions*. **Mol Biol Cell** 16, 3128-3139.

R

Raths, S., Rohrer, J., Crausaz, F., and Riezman, H. (1993). *end3 and end4: two mutants defective in receptor-mediated and fluid-phase endocytosis in Saccharomyces cerevisiae*. **J Cell Biol** 120, 55-65.

Rice, M. C., Czymmek, K., and Kmiec, E. B. (2001). *The potential of nucleic acid repair in functional genomics*. **Nat Biotechnol** 19, 321-326.

Riezman, H. (1985). *Endocytosis in yeast: several of the yeast secretory mutants are defective in endocytosis*. **Cell** 40, 1001-1009.

Rodal, A. A., Kozubowski, L., Goode, B. L., Drubin, D. G., and Hartwig, J. H. (2005a). *Actin and septin ultrastructures at the budding yeast cell cortex*. **Mol Biol Cell** 16, 372-384.

Rodal, A. A., Manning, A. L., Goode, B. L., and Drubin, D. G. (2003). *Negative regulation of yeast WASp by two SH3 domain-containing proteins*. **Curr Biol** 13, 1000-1008.

Rodal, A. A., Sokolova, O., Robins, D. B., Daugherty, K. M., Hippenmeyer, S., Riezman, H., Grigorieff, N., and Goode, B. L. (2005b). *Conformational changes in the Arp2/3 complex leading to actin nucleation*. **Nat Struct Mol Biol** 12, 26-31.

Rodal, A. A., Tetreault, J. W., Lappalainen, P., Drubin, D. G., and Amberg, D. C. (1999). *Aip1p interacts with cofilin to disassemble actin filaments*. **J Cell Biol** 145, 1251-1264.

Rohatgi, R., Ho, H. Y., and Kirschner, M. W. (2000). *Mechanism of N-WASP activation by CDC42 and phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate*. **J Cell Biol** 150, 1299-1310.

Roth, A. F., and Davis, N. G. (2000). *Ubiquitination of the PEST-like endocytosis signal of the yeast a-factor receptor*. **J Biol Chem** 275, 8143-8153.

S

Saito, H., and Tatebayashi, K. (2004). *Regulation of the osmoregulatory HOG MAPK cascade in yeast*. **J Biochem** 136, 267-272.

Salmon, E. D. (1989). *Cytokinesis in animal cells*. **Curr Opin Cell Biol** 1, 541-547.

Sambrook, J., and Russel, D. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Third edn (Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York).

Sasso, S. P., Gilli, R. M., Sari, J. C., Rimet, O. S., and Briand, C. M. (1994). *Thermodynamic study of dihydrofolate reductase inhibitor selectivity*. **Biochim Biophys Acta** 1207, 74-79.

Sawin, K. E. (2002). *Cell polarity: following formin function*. **Curr Biol** 12, R6-8.

Sawin, K. E., and Mitchison, T. J. (1991). *Poleward microtubule flux mitotic spindles assembled in vitro*. **J Cell Biol** 112, 941-954.

Saxon, E., and Bertozzi, C. R. (2000). *Cell surface engineering by a modified Staudinger reaction*. **Science** 287, 2007-2010.

Schafer, D. A. (2004). *Regulating actin dynamics at membranes: a focus on dynamin*. **Traffic** 5, 463-469.

Shaner, N. C., Steinbach, P. A., and Tsien, R. Y. (2005). *A guide to choosing fluorescent proteins*. **Nat Methods** 2, 905-909.

Sheterline, P., and Sparrow, J. C. (1994). *Actin*. **Protein Profile** 1, 1-121.

Shih, S. C., Sloper-Mould, K. E., and Hicke, L. (2000). *Monoubiquitin carries a novel internalization signal that is appended to activated receptors*. **Embo J** 19, 187-198.

Shimomura, O., Johnson, F. H., and Saiga, Y. (1962). *Extraction, purification, and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea*. **J Cell Comparative Physiol** 59, 223-239.

Shortle, D., Haber, J. E., and Botstein, D. (1982). *Lethal disruption of the yeast actin gene by integrative DNA transformation*. **Science** 217, 371-373.

Shortle, D., Novick, P., and Botstein, D. (1984). *Construction and genetic characterization of temperature-sensitive mutant alleles of the yeast actin gene*. **Proc Natl Acad Sci U S A** 81, 4889-4893.

Sikorski, R. S., and Hieter, P. (1989). *A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics** 122, 19-27.

Simonsen, A., Wurmser, A. E., Emr, S. D., and Stenmark, H. (2001). *The role of phosphoinositides in membrane transport*. **Curr Opin Cell Biol** 13, 485-492.

Smythe, E., and Ayscough, K. R. (2003). *The Ark1/Prk1 family of protein kinases. Regulators of endocytosis and the actin cytoskeleton*. **EMBO Reports** 4, 246-251.

Soulard, A., Friant, S., Fitterer, C., Orange, C., Kaneva, G., Mirey, G., and Winsor, B. (2005). *The WASP/Las17p-interacting protein Bzz1p functions with Myo5p in an early stage of endocytosis*. **Protoplasma** 226, 89-101.

Soulard, A., Lechler, T., Spiridonov, V., Shevchenko, A., Li, R., and Winsor, B. (2002). *Saccharomyces cerevisiae Bzz1p is implicated with type I myosins in actin patch polarization and is able to recruit actin-polymerizing machinery in vitro*. **Mol Cell Biol** 22, 7889-7906.

Southern, J. A., Young, D. F., Heaney, F., Baumgartner, W. K., and Randall, R. E. (1991). *Identification of an epitope on the P and V proteins of simian virus 5 that distinguishes between two isolates with different biological characteristics*. **J Gen Virol** 72 (Pt 7), 1551-1557.

Specht, A., and Goeldner, M. (2004). *1-(o-Nitrophenyl)-2,2,2-trifluoroethyl ether derivatives as stable and efficient photoremovable alcohol-protecting groups*. **Angew Chem Int Ed Engl** 43, 2008-2012.

Specht, A., Thomann, J. S., Alarcon, K., Wittayanan, W., Ogden, D., Furuta, T., Kurakawa, Y., and Goeldner, M. (2006). *New photoremovable protecting groups for carboxylic acids with high photolytic efficiencies at near-UV irradiation. Application to the photocontrolled release of L-glutamate*. **Chembiochem** 7, 1690-1695.

Stewart, F. H. C. (1968). *The p-methoxybenzyl ester group in peptide synthesis*. **Austr J Chem** 21, 2543-2550.

Stossel, T. P. (1993). *On the crawling of animal cells*. **Science** 260, 1086-1094.

Stovold, C. F., Millard, T. H., and Machesky, L. M. (2005). *Inclusion of Scar/WAVE3 in a similar complex to Scar/WAVE1 and 2*. **BMC Cell Biol** 6, 11.

Stradal, T. E. B., and Scita, G. (2006). *Protein complexes regulating Arp2/3-mediated actin assembly*. **Curr Opin Cell Biol** 18, 4-10.

Stroffekova, K., Proenza, C., and Beam, K. G. (2001). *The protein-labeling reagent FLASH-EDT2 binds not only to CCXXCC motifs but also non-specifically to endogenous cysteine-rich proteins*. **Pflugers Arch** 442, 859-866.

Suetsugu, S., Hattori, M., Miki, H., Tezuka, T., Yamamoto, T., Mikoshiba, K., and Takenawa, T. (2002). *Sustained activation of N-WASP through phosphorylation is essential for neurite extension*. **Dev Cell** 3, 645-658.

Suetsugu, S., Kurisu, S., Oikawa, T., Yamazaki, D., Oda, A., and Takenawa, T. (2006). *Optimization of WAVE2 complex-induced actin polymerization by membrane-bound IRSp53, PIP(3), and Rac*. **J Cell Biol** 173, 571-585.

Suetsugu, S., Miki, H., and Takenawa, T. (1999). *Identification of two human WAVE/SCAR homologues as general actin regulatory molecules which associate with the Arp2/3 complex*. **Biochem Biophys Res Commun** 260, 296-302.

Suetsugu, S., Yamazaki, D., Kurisu, S., and Takenawa, T. (2003). *Differential roles of WAVE1 and WAVE2 in dorsal and peripheral ruffle formation for fibroblast cell migration*. **Dev Cell** 5, 595-609.

Summerer, D., Chen, S., Wu, N., Deiters, A., Chin, J. W., and Schultz, P. G. (2006). *A genetically encoded fluorescent amino acid*. **Proc Natl Acad Sci U S A** 103, 9785-9789.

Sun, Y., Martin, A. C., and Drubin, D. G. (2006). *Endocytic internalization in budding yeast requires coordinated actin nucleation and myosin motor activity*. **Dev Cell** 11, 33-46.

Svitkina, T. M., and Borisy, G. G. (1999). *Arp2/3 complex and actin depolymerizing factor/cofilin in dendritic organization and treadmilling of actin filament array in lamellipodia*. **J Cell Biol** 145, 1009-1026.

Symons, M., Derry, J. M., Karlak, B., Jiang, S., Lemahieu, V., McCormick, F., Francke, U., and Abo, A. (1996). *Wiskott-Aldrich syndrome protein, a novel effector for the GTPase CDC42Hs, is implicated in actin polymerization*. **Cell** 84, 723-734.

T

Takenawa, T., and Miki, H. (2001). *WASP and WAVE family proteins: key molecules for rapid rearrangement of cortical actin filaments and cell movement*. **J Cell Sci** 114, 1801-1809.

Takenawa, T., and Suetsugu, S. (2007). *The WASP-WAVE protein network: connecting the membrane to the cytoskeleton*. **Nat Rev Mol Cell Biol** 8, 37-48.

Tan, P. K., Howard, J. P., and Payne, G. S. (1996). *The sequence NPFXD defines a new class of endocytosis signal in Saccharomyces cerevisiae*. **J Cell Biol** 135, 1789-1800.

Tang, H.-Y., Munn, A., and Cai, M. (1997). *EH domain proteins Pan1p and End3p are components of a complex that plays a dual role in organization of the cortical actin cytoskeleton and endocytosis in Saccharomyces cerevisiae*. **Mol Cell Biol** 17, 4294-4304.

Tang, H. Y., Xu, J., and Cai, M. (2000). *Pan1p, End3p, and S1a1p, three yeast proteins required for normal cortical actin cytoskeleton organization, associate with each other and play essential roles in cell wall morphogenesis*. **Mol Cell Biol** 20, 12-25.

Theriot, J. A., and Mitchison, T. J. (1991). *Actin microfilament dynamics in locomoting cells*. **Nature** 352, 126-131.

Tian, L., Nelson, D. L., and Stewart, D. M. (2000). *Cdc42-interacting protein 4 mediates binding of the Wiskott-Aldrich syndrome protein to microtubules*. **J Biol Chem** 275, 7854-7861.

Tong, A. H. Y., Drees, B., Nardelli, G., Bader, G. D., Brannetti, B., Castagnoti, L., Evangelista, M., Ferracuti, S., Nelson, B., Paoluzi, S., *et al.* (2002). *A combined experimental and computational strategy to define protein interaction networks for peptide recognition modules*. **Science** 295, 321-324.

Toret, C. P., and Drubin, D. G. (2006). *The budding yeast endocytic pathway*. **J Cell Sci** 119, 4585-4587.

Torres, E., and Rosen, M. K. (2003). *Contingent phosphorylation/dephosphorylation provides a mechanism of molecular memory in WASP*. **Mol Cell** 11, 1215-1227.

Toshima, J., Toshima, J. Y., Martin, A. C., and Drubin, D. G. (2005). *Phosphoregulation of Arp2/3-dependent actin assembly during receptor-mediated endocytosis*. **Nature Cell Biology** 7, 246-254.

Tsien, R. Y. (1998). *The green fluorescent protein*. **Ann Rev Biochem** 67, 509-544.

Tsujita, K., Suetsugu, S., Sasaki, N., Furutani, M., Oikawa, T., and Takenawa, T. (2006). *Coordination between the actin cytoskeleton and membrane deformation by a novel membrane tubulation domain of PCH proteins is involved in endocytosis*. **J Cell Biol** 172, 269-279.

U

Uruno, T., Liu, J., Zhang, P., Fan, Y.-X., Egile, C., Li, R., Mueller, S. C., and Zhan, X. (2001). *Activation of Arp2/3 complex-mediated actin polymerization by cortactin*. **Nat Cell Biol** 3, 259-266.

V

Vaduva, G., Martin, N. C., and Hopper, A. K. (1997). *Actin-binding verprolin is a polarity development protein required for the morphogenesis and function of the yeast actin cytoskeleton*. **J Cell Biol** 139, 1821-1833.

Verkhusha, V. V., and Lukyanov, K. A. (2004). *The molecular properties and applications of Anthozoa fluorescent proteins and chromoproteins*. **Nat Biotechnol** 22, 289-296.

Vida, T. A., and Emr, S. D. (1995). *A new vital stain for visualizing vacuolar membrane dynamics and endocytosis in yeast*. **J Cell Biol** 128, 779-792.

Voegtli, W. C., Madrona, A. Y., and Wilson, D. K. (2003). *The structure of Aip1p, a WD repeat protein that regulates Cofilin-mediated actin depolymerization*. **J Biol Chem** 278, 34373-34379.

Volland, C., Galan, J. M., Urban-Grimal, D., Devilliers, G., and Haguenauer-Tsapis, R. (1994). *Endocytose and degradation of the uracil permease of S. cerevisiae under stress conditions: possible role of ubiquitin*. **Folia Microbiol** 39, 554-557.

W

Walbert, S., Pfleiderer, W., and Steiner, U. E. (2001). *Photolabile protecting groups for nucleosides: mechanistic studies of the 2-(2-nitrophenyl)ethyl group*. **Helv Chim Acta** 84, 1601-1611.

Walther, T. C., Brickner, J. H., Aguilar, P. S., Bernales, S., Pantoja, C., and Walter, P. (2006). *Eisosomes mark static sites of endocytosis*. **Nature** 439, 998-1003.

Wang, J., Xie, J., and Schultz, P. G. (2006). *A genetically encoded fluorescent amino acid*. **J Am Chem Soc** 128, 8738-8739.

Wang, L., and Schultz, P. G. (2002). *Expanding the genetic code*. **Chem Commun**, 1-11.

Wang, Q., Chan, T. R., Hilgraf, R., Fokin, V. V., Sharpless, K. B., and Finn, M. G. (2003). *Bioconjugation by copper(I)-catalyzed azide-alkyne [3 + 2] cycloaddition*. **J Am Chem Soc** 125, 3192-3193.

Wang, W., and Ferro-Novick, S. (2002). *A Ypt32p exchange factor is a putative effector of Ypt1p*. **Mol Biol Cell** 13, 3336-3343.

Weaver, A. M., Heuser, J. E., Karginov, A. V., Lee, W.-l., Parsons, J. T., and Cooper, J. A. (2002). *Interaction of Cortactin and N-WASp with Arp2/3 Complex*. **Curr Biol** 12, 1270-1278.

Weaver, A. M., Karginov, A. V., Kinley, A. W., Weed, S. A., Li, Y., Parsons, J. T., and Cooper, J. A. (2001). *Cortactin promotes and stabilizes Arp2/3-induced actin filament network formation*. **Curr Biol** 11, 370-374.

Wegner, A., and Isenberg, G. (1983). *12-fold difference between the critical monomer concentrations of the two ends of actin filaments in physiological salt conditions*. **Proc Natl Acad Sci U S A** 80, 4922-4925.

Welch, M. D. (1999). *The world according to Arp: regulation of actin nucleation by the Arp2/3 complex*. **Trends Cell Biol** 9, 423-427.

Welch, M. D., DePace, A. H., Verma, S., Iwamatsu, A., and Mitchison, T. J. (1997). *The human Arp2/3 complex is composed of evolutionarily conserved subunits and is localized to cellular regions of dynamic actin filament assembly*. **J Cell Biol** 138, 375-384.

Wendland, B., and Emr, S. D. (1998). *Pan1p, yeast eps15, functions as a multivalent adaptor that coordinates protein-protein interactions essential for endocytosis*. **J Cell Biol** 141, 71-84.

Willner, I., Blonder, R., Katz, E., Stocker, A., and Buckmann, A. F. (1996). *Reconstitution of apo-glucose oxidase with a nitrospiropyran-modified FAD cofactor yields a photoswitchable biocatalyst for amperometric transduction of recorded optical signals*. **J Am Chem Soc** 118, 5310-5311.

Winder, S. J. (2003). *Structural insights into actin-binding, branching and bundling proteins*. **Curr Opin Cell Biol** 15, 14-22.

Winder, S. J., and Ayscough, K. R. (2005). *Actin-binding proteins*. **J Cell Sci** 118, 651-654.

Winsor, B., and Schiebel, E. (1997). *Review: an overview of the Saccharomyces cerevisiae microtubule and microfilament cytoskeleton*. **Yeast** 13, 399-434.

Winston, F., Dollard, C., and Ricupero-Hovasse, S. L. (1995). *Construction of a set of convenient Saccharomyces cerevisiae strains that are isogenic to S288C*. **Yeast** 11, 53-55.

Winter, D., Lechler, T., and Li, R. (1999a). *Activation of the yeast Arp2/3 complex by Bee1p, a WASP-family protein*. **Curr Biol** 9, 501-504.

Winter, D., Podtelejnikov, A. V., Mann, M., and Li, R. (1997). *The complex containing actin-related proteins Arp2 and Arp3 is required for the motility and integrity of yeast actin patches*. **Curr Biol** 7, 519-529.

Winter, D. C., Choe, E. Y., and Li, R. (1999b). *Genetic dissection of the budding yeast Arp2/3 complex: a comparison of the in vivo and structural roles of individual subunits*. **Proc Natl Acad Sci U S A** 96, 7288-7293.

Wise, C. A., Gillum, J. D., Seidman, C. E., Lindor, N. M., Veile, R., Bashiardes, S., and Lovett, M. (2002). *Mutations in CD2BP1 disrupt binding to PTP PEST and are responsible for PAPA syndrome, an autoinflammatory disorder*. **Hum Mol Genet** 11, 961-969.

Wu, C., Lee, S.-F., Furmaniak-Kazmierczak, E., Cote, G. P., Thomas, D. Y., and Leberer, E. (1996). *Activation of myosin-I by members of the Ste20p protein kinase family*. **J Biol Chem** 271, 31787-31790.

X

Xu, C., and Webb, W. W. (1996). *Measurement of two-photon excitation cross sections of molecular fluorophores with data from 690 to 1050 nm*. **J Optical Soc Am B: Optical Physics** 13, 481-491.

Xu, C., and Webb, W. W. (1997). Multiphoton excitation of molecular fluorophores and nonlinear laser microscopy, In *Topics in Fluorescence Spectroscopy*, J. Lakowicz, ed. (Plenum Press, New York), pp. 471-540.

Y

Yang, F., Moss, L. G., and Phillips, G. N., Jr. (1996). *The molecular structure of green fluorescent protein*. **Nat Biotechnol** 14, 1246-1251.

Yang, S., Cope, M. J., and Drubin, D. G. (1999). *Sla2p is associated with the yeast cortical actin cytoskeleton via redundant localization signals*. **Mol Biol Cell** 10, 2265-2283.

Yeo, D. S., Srinivasan, R., Uttamchandani, M., Chen, G. Y., Zhu, Q., and Yao, S. Q. (2003). *Cell-permeable small molecule probes for site-specific labeling of proteins*. **Chem Commun**, 2870-2871.

Yin, J., Liu, F., Li, X., and Walsh, C. T. (2004). *Labeling proteins with small molecules by site-specific posttranslational modification*. **J Am Chem Soc** 126, 7754-7755.

Young, M. E., Cooper, J. A., and Bridgman, P. C. (2004). *Yeast actin patches are networks of branched actin filaments*. **J Cell Biol** 166, 629-635.

Z

Zhang, J., Campbell, R. E., Ting, A. Y., and Tsien, R. Y. (2002). *Creating New Fluorescent Probes for Cell Biology*. **Nat Rev Mol Cell Biol** 3, 906-918.

Zhang, Z., Smith, B. A., Wang, L., Brock, A., Cho, C., and Schultz, P. G. (2003). *A new strategy for the site-specific modification of proteins in vivo*. **Biochemistry** 42, 6735-6746.

Zhao, Y., Zheng, Q., Dakin, K., Xu, K., Martinez, M. L., and Li, W. H. (2004). *New caged coumarin fluorophores with extraordinary uncaging cross sections suitable for biological imaging applications*. **J Am Chem Soc** 126, 4653-4663.

Zhu, H., Bilgin, M., Bangham, R., Hall, D., Casamayor, A., Bertone, P., Lan, N., Jansen, R., Bidlingmaier, S., Houfek, T., *et al.* (2001). *Global analysis of protein activities using proteome chips*. **Science** 293, 2101-2105.

Zimmer, M. (2002). *Green fluorescent protein (GFP): applications, structure, and related photophysical behavior*. **Chem Rev** 102, 759-781.

Zipfel, W. R., Williams, R. M., and Webb, W. W. (2003). *Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences*. **Nat Biotechnol** 21, 1369-1377.

Zlotnik, H., Fernandez, M. P., Bowers, B., and Cabib, E. (1984). *Saccharomyces cerevisiae mannoproteins form an external cell wall layer that determines wall porosity*. **J Bacteriol** 159, 1018-1026.

Annexes

The WASP/Las17p-interacting protein Bzz1p functions with Myo5p in an early stage of endocytosis

A. SOULARD, S. FRIANT, C. FITTERER, C. ORANGE, G. KANEVA, G. MIREY et B. WINSOR

Protoplasma, 2005, Vol. 226, Pages 89-101

Pages 243-255 :

SH3 domain-containing proteins and the actin cytoskeleton in yeast

G. MIREY, A. SOULARD, C. ORANGE, S. FRIANT and B. WINSOR

Biochemical society transactions, 2005, Vol. 33, Pages 1247-1249

RESUME :
Le cytosquelette d'une cellule est constitué entre autres d'un réseau complexe de filaments protéiques comprenant les filaments d'actine. La polymérisation de l'actine est un processus crucial extrêmement conservé. Mon objectif de thèse consistait à développer une nouvelle sonde fluorescente photoactivable afin d'étudier dans le temps et l'espace les protéines à domaine SH3 affectant le complexe d'activation de la polymérisation de l'actine. La première étape était de développer un fluorophore photoactivable non fluorescent comportant un motif de reconnaissance capable de reconnaître une étiquette protéique. Une stratégie de synthèse utilisant un dérivé bis-arsenié de la résorufine a été tentée sans succès. Une nouvelle stratégie a été développée : la synthèse d'une coumarine photoactivable portant un motif Ni-NTA (acide nitrilotriacétique) capable de se lier à une étiquette protéique polyhistidine. La synthèse totale a été réalisée et les propriétés photochimiques ont été déterminées. L'entrée de cette molécule dans des cellules HeLa n'étant pas concluante, une nouvelle molécule ne comportant que deux acides a été synthétisée, le troisième acide étant acétylé. Cette molécule est capable de pénétrer dans les cellules et ne semble pas être toxique. En parallèle au développement chimique des sondes, mes études ont porté sur la dynamique et les interactions fonctionnelles d'une nouvelle protéine, Bzz1p. Cette dernière est une protéine avec deux domaines SH3 et un domaine FCH, membre de la famille PCH (Pombe Cdc15 Homology) dont d'autres membres sont connus pour être impliqués dans la cytodiérèse et l'endocytose. Des interactions protéine-protéines ont été recherchées sur la protéine entière par un crible de surproduction de Bzz1p ; par l'utilisation d'une puce du protéome de levure et sur les deux domaines SH3 de Bzz1p par GST-pulldown analysé par spectrométrie de masse. Des partenaires lipidiques du domaine FCH de Bzz1p ont été identifiés par la technique du « lipid blot ». Ceux-ci restent à être confirmés *in vivo*. De nouveaux partenaires suggèrent que Bzz1p pourrait agir au niveau de différentes membranes de la cellule.

Mots-clés : fluorophore photoactivable, étiquette protéique, NTA, *Saccharomyces cerevisiae*, cytosquelette d'actine corticale, Bzz1p.

ABSTRACT:
The cell cytoskeleton consists of a complex proteinaceous filaments network, including actin filaments. The actin polymerization is a highly conserved and crucial process. The aim of my thesis was the development of a new fluorescent photoactivable probe allowing the spatial and temporal study of SH3 domain proteins that affect the actin polymerization activation complex. The first step was to develop a photoactivable fluorophore bearing a recognition motif able to recognize a protein tag. A synthesis strategy based on a bis-arsenic resorufin derivative was tested, but failed. A new strategy was then developed: the synthesis of a photoactivable coumarin bearing a Ni-NTA (nitrilotriacetic acid) recognition motif able to bind a polyhistidine tag. The total synthesis was realized and photochemical properties were determined. Since the tests of the penetration of this molecule into HeLa cells remained inconclusive, a new molecule bearing only two acidic functions was synthesized, with the third acidic function acetylated. This molecule is able to penetrate into cells, and no toxicity was detected. In parallel to the chemical development of the probes, my studies also concerned the dynamics and functional interactions of a new protein: Bzz1p. This protein contains two SH3 domains, as well as a FCH domain and is a member of the PCH family (Pombe Cdc15 Homology) which includes proteins playing a role in cytokinesis and endocytosis. Protein-protein interactions of the full-length Bzz1p were analysed by overexpression screening and by the use of yeast proteome array, while those of the SH3 domains were studied by GST-pulldown assays followed by mass spectrometry analysis. Lipid partners of the FCH domain of Bzz1p were identified by lipid blotting ;their confirmation *in vivo* is in progress. The partners identified suggest that Bzz1p could act at several different membrane sites in the cell.

Key-words: caged fluorophore, protein tag, NTA, *Saccharomyces cerevisiae*, cortical actin cytoskeleton, Bzz1p.